UNIVERSITE DE PARIS
Année 1966

FACULTE DE PHARMACIE
Série U - n° 425

THESE

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS
(Mention Pharmacie)

par

Jean-Paul PAPIN

Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Paris

soutenue le 18 avril 1966

RECHERCHES SUR L'HEMOLYSINE DE LAPIN (anti-mouton)

JURY : MM. J.E. COURTOIS, Président,

A. GERMAN
F. PERCHERON
} Examinateurs

UNIVERSITE DE PARIS
Année 1966

FACULTE DE PHARMACIE
Série U - n° 425

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS
(Mention Pharmacie)

par

Jean-Paul PAPIN

Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Paris

soutenue le 18 avril 1966

RECHERCHES SUR L'HEMOLYSINE DE LAPIN (anti-mouton)

JURY : MM. J.E. COURTOIS, Président,

A. GERMAN
F. PERCHERON
} Examinateurs

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE. O ✵. C. Q Ord. Nat. du Mérite	*Doyen*
	MM. JANOT. O ✵. C. Q.	*Assesseur*
	P. MALANGEAU. O. Q.	*Assesseur*
	L. RODINEAU. ✵ O. Q.	*Secrétaire Général*
Mme	S. FERRARI. Q.	*Attachée Principale*
	M. L. ESPINASSE. O. Q.	*Attachée*
M.	L. JEANDEL. O. Q.	*Attachée*
Mme	C. PEILLON.	*Attachée*
Mme	G. RENNETEAU.	*Attachée*
M.	A. BRENN. ✵.	*Attaché*
Mle	G. BIDEAU.	*Secrétaire*
Mme	S. CERTAIN. O. Q.	*Secrétaire*
	M. COUSIN.	*Secrétaire*
M.	A. DROUILLY. O. Q.	*Secrétaire*
Mme	T. ROUVEURE.	*Secrétaire*
Mme	L. WARNESSON. Q.	*Secrétaire*

DOYEN HONORAIRE

M.	R. FABRE. C ✵ C. Q.	*Membre de l'Institut*

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	M. DELEPINE. C. ✵. C. Q	*Membre de l'Institut*
	L. LAUNOY. O. ✵. O. Q	
	P. FLEURY. O. ✵. C. Q	
	M. PICON. O. ✵. O. Q	
	C. BEDEL. ✵. O. Q	
	R. FABRE. C. ✵. C. Q	*Membre de l'Institut*

PROFESSEURS

MM.	M. M. JANOT. O. ✻. C. Q	*Pharmacie galénique (T)*
	G. VALETTE. C. ✻. C. Q Ord. Nat. du Mérite	*Pharmacodynamie (T)*
	R. PARIS. ✻. C. Q	*Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)*
	M. GUILLOT. ✻. O. Q	*Physique (T)*
	J.A. GAUTIER. ✻. O. Q	*Chimie organique (T)*
Mle	S. LAMBIN. ✻. O. Q	*Microbiologie (T)*
MM.	Y. RAOUL. ✻. O. Q	*Physiologie (T)*
	J. COURTOIS. ✻. O. Q	*Chimie biologique (T)*
	L. DOMANGE. ✻. C. Q	*Chimie minérale (T)*
	P. CRETE. ✻. O. Q	*Botanique (T)*
	R. TRUHAUT. O. ✻. O. Q	*Toxicologie et Hygiène industrielle (T)*
	A. MORETTE. ✻. O. Q	*Hydrologie (T)*
	R. CAVIER. O. Q	*Parasitologie (T)*
	A. QUEVAUVILLER. ✻. O. Q	*Hygiène et Education Sanitaire (T)*
	R. MOREAU. ✻. O. Q	*Pharmacie chimique (T)*
	A. GERMAN. O. Q	*Virologie et Sérologie (T)*
	M. PIETTE. ✻. O. Q	*Biologie sanguine (T)*
	P. MALANGEAU. O. Q	*Chimie analytique (T)*
	M. GIRARD. O. Q	*Biochimie appliquée (T)*
	G. DILLEMANN.....	*Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)*
	G. DEYSSON. O. Q	*Cytologie végétale (T)*
	J. FLAHAUT. Q	*Minéralogie (T)*
	C. BOUDENE.....	*Toxicologie et Hygiène industrielle (T)*
	J. RENAULT. Q.....	*Chimie organique (T)*
	A. LE HIR.....	*Pharmacie galénique*
	P. LARUELLE.....	*Physique*
	P. ROSSIGNOL.....	*Pharmacodynamie*
	A. MANGEOT. O. Q	*Pharmacie galénique industrielle*
	P. DELAVEAU.....	*Matière médicale*
	Y. COHEN.....	*Sciences naturelles*
	H. RENAULT.....	*Physique*
M.	R. BOURDON.....	*Chimie analytique*
M.	P. REYNAUD.....	*Sciences Physico-chimiques*

MAITRES DE CONFERENCES

	G. LE MOAN.....	*Sciences appliquées*
	C. PAOLETTI.....	*Sciences appliquées*
	J. POISSON.....	*Sciences naturelles*
	A. DESVIGNES. Q.....	*Cryptogamie et technique bactériologique*
	F. PERCHERON.....	*Sciences appliquées*
	J. SAVEL.....	*Biologie animale*
	J. BORY. Q.....	*Sciences naturelles*
	M. MIOCQUE.....	*Chimie organique*
	J. L. GUIGNARD.....	*Botanique générale*
	J. C. GOUNELLE.....	*Sciences naturelles*
	P. BINET.....	*Biologie animale et Zoologie*
	C. COMBET-FARNOUX.....	*Chimie organique*
Mme	M. PLAT.....	*Sciences appliquées*
MM.	E. DELACOUX.....	*Sciences physico-Chimiques*
	J. DIDRY (F.F.).....	*Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales*

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

Mme	J. BLANC (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A. N)*
MM.	A. CARLIER (F.F.).....	*C.E.S. Pharmacie galénique Industrielle*
	J. CHARLES (F.F.).....	*Mathématiques*
	C. DAGRON (F.F.).....	*Chimie préparation (1re A. N)*
Mle	M. T. DECAUDIN (F.F.).....	*Biologie animale (3e A.).*
M.	C. DREUX (F.F.).....	*C.E.S. Electrochimie appliquée à l'analyse*
Mle	G. DUMANT (F.F.).....	*Chimie préparations (1re A. N)*
MM.	P. GEORGES (F.F.).....	*C.E.S. Parasitologie*
	P. GESTEAU. ✲ . O . Q.....	*C.E.S. Biochimie*
Mle	M. J. GOURSAT (F.F.).....	*Chaire de botanique*
MM.	H. GUERIN. ✲ . O . Q.....	*Biologie végétale (3e A)*
	M. GUERNET.....	*Chimie (2e et 3e années)*
	M. HAMON. (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A. N)*
	J. HARISPE. ✲ O . Q.....	*Chimie préparations (1re A)*
	G. HAZEBROUCQ (F.F.).....	*Physique*

M.	J. HENRY.....	*Chimie (4e Année)*
Mme	J. HUBERT.....	*C.E.S. Bactériologie*
Mme	M. J. HURON (F.F.).....	*Mathématiques*
M.	Y. LAROCHE.....	*Chaire de Physique*
Mle	Y. JUND.....	*C.E.S. Microbiologie*
M.	M. LEBOEUF (F.F.).....	*C.E.S. Pharmacotechnie*
Mme	N. LEGER (F.F.).....	*Zoologie*
M.	R. LELUC.....	*Microbiologie (4e A)*
M.	A. LEMONNIER.....	*Chimie analyses (2e et 3e A)*
Mme	S. LEMONTEY.....	*Chimie (4e A).*
Mle	M. LONGEVIALLE (F.F.).....	*Chaire de botanique*
Mle	S. LONGUEVALLE. O .Q	*Chimie examens*
MM.	J. MANDEREAU (F.F).....	*C.E.S. Pharmacotechnie*
	H. MARTIN FRERE (F.F.).....	*Chimie préparations (1re A)*
Mle	H. MORIN. O .Q	*C.E.S. Pharmacodynamie*
M.	H. MOSKOWITZ, (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A N.)*
Mme	M. J. NOTTEGHEN (F.F.).....	*Zoologie*
MM.	NGUYEN PHU LICH.....	*C.E.S. Toxicologie*
	M. PARIS (F.F.).....	*C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Biologie)*
	R. PERLES.....	*C.E.S. Biochimie*
	J. PESTIS (F.F.).....	*Biologie animale (2e A)*
	P. POULLAIN.....	*C.E.S. Hématologie*
	J. RIVET (F.F.).....	*Chaire de Physique*
Mme	M. ROBERT.....	*C.E.S. Sérologie*
Mle	A. ROLLEN. ✻ .O .Q	*Biologie végétale (2e A)*
Mme	N. SALES (F.F.).....	*Biologie animale*
Mle	L. SEGUIN. O . Q (F.F.)	*C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (physico-chimie)*
Mme	M. SEILLER (F.F.).....	*Pharmacie galénique industrielle*
M.	J. YONGER (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A)*

BIBLIOTHEQUE

Mle	Y. RUYSSEN. ✻ . O . Q	*Conservateur, chargée de la direction*
Mle	S. LAVAUD. ✻ . O . Q	*Conservateur*
Mme	G. KREHMER. O . Q	*Conservateur*
Mme	A. DESGRIPPES. O . Q	*Bibliothécaire*

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS

Professeur à la Faculté de Pharmacie,

Pharmacien Chef des Hôpitaux de Paris.

qui m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

En témoignage de mon profond respect et de ma plus vive reconnaissance.

A Monsieur le Professeur A. GERMAN

Professeur à la Faculté de Pharmacie

Pharmacien Chef des Hôpitaux de Paris,

qui a bien voulu examiner ce travail et m'a accueilli dans son équipe d'internes à la Salpétrière.

En témoignage de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur F. PERCHERON

Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie

Pharmacien Chef des Hôpitaux de Paris,

qui a accepté d'être juge de mon travail

En témoignage de mon respect.

A mes Parents

A ma Femme

A mes Amis.

A Monsieur le Professeur P. LEPINE

Chef du Service des Virus à l'Institut Pasteur

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie de Médecine,

qui m'a fait le grand honneur de m'accueillir dans son Service.

En témoignage de ma grande admiration.

A Monsieur J.L. DELSAL

Docteur ès-sciences physiques

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur

sans qui, cette thèse n'aurait jamais été entreprise et qui, tout au long de ce travail, me guida constamment dans mes recherches.

En témoignage de ma plus profonde gratitude.

A Monsieur R. LAPORTE

Docteur en Médecine

Chef de Service à l'Institut Pasteur

qui me conseilla pour la partie immunologique de mon travail.

Mes bien vifs remerciements.

- INTRODUCTION -

Nous nous proposons, au cours de l'étude qui va suivre, d'isoler l'hémolysine 19 S la plus pure possible et en quantité suffisante, afin d'obtenir assez de produit pour effectuer son analyse ; en particulier la recherche des oses que renferme, ainsi que nous le montrerons, cette glycoprotéine.

Pour atteindre ce but, nous suivrons les étapes résumées ci-après :

Nous étudierons tout d'abord, dans la première partie du travail, le produit du point de vue immunologique afin de définir son mode de dosage, les conditions les plus favorables de production et examiner également une méthode de purification biologique.

- Dans la deuxième partie, nous passerons en revue, les différents procédés chimiques et physiques pouvant être retenus pour isoler cette hémolysine.

Dans la troisième partie, nous préparerons le lot d'hémolysine purifiée en combinant la chromatographie sur le gel de Séphadex G 200 et les gradients de centrifugation.

Enfin, dans la quatrième partie, nous analyserons ce produit en particulier du point de vue teneur en oses et le comparerons à diverses autres glycoprotéines.

oOo

- HISTORIQUE -

L'hémolysine d'immunisation est le résultat d'une des manifestations les plus spectaculaires de l'activité des anticorps.

BORDET (1) prépara le premier ce produit en 1898 : "Il injecta à des cobayes, 5 à 6 fois de suite, du sang de lapin défibriné. Ils supportent ce traitement sans troubles ; au bout de quelques temps, on leur retire du sang et le sérum obtenu présente les caractères suivants :

1) Mis en contact avec le sang de lapin, il agglomère les globules avec une grande énergie.

2) Les globules, d'abord agglomérés par ce sérum, présentent ensuite un phénomène de destruction rapide et intense. Si l'on mélange, par exemple, une partie de sang de lapin à deux ou trois parties de sérum actif, le mélange devient rouge clair et limpide au bout de deux à trois minutes ; au microscope, on ne voit plus dans le liquide que des stromas de globules".

BORDET avait donc mis en évidence à la fois l'hémagglutinine et l'hémolysine.

Ce dernier produit présente un grand intérêt, car il est à la base de toute une partie de la sérologie permettant la révélation des réactions dites de "déviation du complément", qui sont d'une utilisation journalière et s'étendent à un très vaste domaine de l'immunologie.

La sérologie utilisa ce produit pendant longtemps avant que l'on ne détermine une propriété physique essentielle de ce corps ; à savoir :

sa constante de sédimentation mesurée par PAIC (2) par ultra-centrifugation et qui est de 18, 9 S (ou 19 S en pratique courante).

Elle se différencie ainsi grandement des autres protides du sérum hémolytique et en particulier de la globuline de constante de sédimentation 7 S et qui ne contient que très peu d'hémolysine.

L'hémolysine est donc un protide particulier et c'est sur ce corps 19 S que portera notre étude.

o0o

PREMIERE PARTIE

- IMMUNOLOGIE -

Nous énumérons tout d'abord les notions et techniques d'immunologie exploitées dans notre étude, tant pour l'examen physico-chimique et le dosage de l'hémolysine recherchée, que pour sa préparation proprement dite.

Nous rappelons les définitions de l'unité hémolytique et du titre d'un sérum dont la connaissance est nécéssaire pour le calcul des rendements des diverses opérations de séparation et de purification de l'hémolysine.

Nous indiquons ensuite les diverses méthodes de caractérisation et de dosage rapide ou précis de l'activité hémolytique.

Lors des essais de préparation de la matière première, nous déterminons, en particulier, le temps optimal d'immunisation pour obtenir un produit de titre élevé, renfermant le maximum d'hémolysine 19 S et le minimum d'hémolysine 7 S.

Deux procédés d'immunisation sont, à cet effet, successivement éprouvés : ceux de TALMAGE et de DARTER. Puis, nous recherchons le moyen convenable de conserver l'hémolysine sans altération.

Enfin, le résultat de l'étude de la résistance de l'hémolysine à des facteurs tels que pH du milieu et température, permet l'essai d'une méthode simple de purification par fixation sur Stromas suivie d'élution.

A / DEFINITION DE L'UNITE HEMOLYTIQUE.

RAPP (3) démontra que 10 molécules environ d'hémolysine, en présence d'un excès de complément, suffisent pour lyser une hématie.

Certes,ce moyen de titrer l'hémolysine serait le meilleur : il aurait pour base la molécule d'anticorps, mais on ne procède pas ainsi en sérologie.

MAYER (4) définit comme suit l'unité hémolytique 50 % : c'est la quantité d'antisérum, exprimée en ml, qui, en présence de 12 unités 50 % de complément, à la concentration optimale en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} et à la force ionique de 0,147, lyse, à la température de 37°C dans un volume de réaction de 5 ml, 500 millions d'hématies sur un total de un milliard, en une durée de 15 minutes exactement.

Nous avons adopté finalement, pour ce travail, la définition que donne l'Institut Pasteur pour le produit qu'il commercialise ; à savoir : un sérum hémolytique dilué de façon à contenir une unité par ml sensibilise suffisamment 1 ml d'une suspension d'hématies de mouton, lavées, ramenée au volume initial du sang et diluée ensuite vingt fois avec l'eau physiologique, pour que 1 ml de complément normal de cobaye dilué à 1/20ème, les lyse totalement en vingt minutes de séjour au bain-Marie à 37°C.

De l'unité, on passe facilement au titre (5). On appelle titre d'un sérum, le rapport de l'unité hémolytique à l'unité de volume (1 ml), c'est-à-dire, le nombre d'unités hémolytiques qu'il contient par ml ; le titre correspond donc au taux auquel il faut diluer ce sérum pour qu'il contienne une unité hémolytique par ml.

B / TECHNIQUES SEROLOGIQUES UTILISEES.

Nous exposerons brièvement les techniques sérologiques mises en oeuvre au cours de nos expériences, décrites par la suite.

Dans toutes ces techniques, on utilise le tampon de MAYER (6) comme milieu de réaction et comme diluant.

Il est constitué par une solution isotonique de Na Cl, tamponnée au Véronal - Véronal Sodique à PH 7,3 - 7,4, et renferme des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} indispensables pour obtenir une bonne activité du complément.

On le prépare à partir de la solution mère suivante :

NaCl		85 g
Véronal acide		5,75 g
Véronal sodique		3,75 g
Eau distillée	q.s.p.	2000 ml

qui est diluée pour emploi au 1/5° et à laquelle on ajoute par litre de solution diluée :

$CaCl_2$	0,00015 M
$MgCl_2$	0,0005 M

et ce par addition par litre de 1 ml de chacune des solutions suivantes :

$CaCl_2$ $2H_2O$ à 2,2 %

$MgCl_2$ $6H_2O$ à 10,15 %

I - ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE (7)

On mélange un dixième de ml d'une série de dilutions d'antisérum ou de fractions d'antisérum à tester avec chaque fois 0,3 ml de suspension globulaire à 1 % et on fait incuber à 37°C pendant 30 minutes, puis on abandonne une nuit à la température du laboratoire. La plus petite quantité d'antisérum ou de fraction d'antisérum nécéssaire pour provoquer l'agglutination de la quantité précédente de globules rouges, est définie comme une unité agglutinante (U-A).

II - ACTIVITE HEMOLYTIQUE.

On utilise pour ces réactions le complément fabriqué par l'Institut Pasteur, à partir de sérum de cobaye lyophylisé et qui est reconstitué au moment de l'emploi avec un tampon conservateur à son volume initial (0,70 ml par ampoule) ; il est amené à un taux de dilution convenable précisé pour chaque réaction.

Les globules mis en oeuvre dans ces réactions, sont des hématies de mouton obtenues en défibrinant le sang à la saignée. Les hématies sont lavées trois fois dans de l'eau physiologique pour éliminer le sérum de mouton. Elles sont conservées en culot, en présence d'antibiotiques à + 4°C pendant une semaine. On dilue ce culot globulaire extemporanément.

1) Recherche des fractions présentant une activité hémolytique (8)

On mélange :

- 0,05 ml du liquide à tester
- 0,5 ml du tampon de MAYER
- 0,5 ml de globules dilués au 1/10ème
- 0,5 ml de complément dilué au 1/50ème

On complète à 3 ml avec du tampon de MAYER, porte 45 minutes à 37°C et arrête la réaction au bain de glace.

On centrifuge et lit au spectrophotomètre à 540 mμ. Cette technique permet d'identifier la présence d'hémolysine, mais non son dosage. Elle a l'avantage de la simplicité, car il n'est fait qu'un tube par produit à analyser. Elle nous a permis l'établissement rapide des courbes d'activité des chromatographies ou des gradients et de localiser ainsi les pics actifs.

2) Dosage rapide (8)

Il se fait en hémolyse 100 %.

On fait pour chaque produit une gamme de dilutions, chaque tube

contenant la moitié du principe actif contenu dans le tube précédent, sous un volume de 0, 5 ml.

Chaque tube renferme :

- 0, 5 ml de dilution
- 0, 5 ml de complément dilué au 1/20ème
- 0, 5 ml de globules dilués au 1/56ème.

On porte 20 minutes au bain-Maris à 37°C.

On recherche le premier tube présentant une hémolyse totale et on détermine son degré de dilution pour obtenir le 1/2 titre.

On doit multiplier par deux, car on a travaillé sur 0, 5 ml et l'unité étant définie par rapport au ml.

On contrôle toujours la série de dosages en effectuant parallèlement le dosage d'un sérum connu.

Ce dosage est imprécis car d'un tube à son suivant, le titre varie du simple au double.

Cependant, il est assez rapide et simple et nous l'avons utilisé pour tester par exemple les sérums des lapins ayant été immunisés pour obtenir la matière première nécéssaire à ce travail.

3) Titrage en Unités hémolytiques 50 %.

ROULIER (9) et TALIAFERRO (10) ont mis en évidence, à la même époque, l'intérêt de l'unité 50 %.

Ce mode de titrage permet d'évaluer entre deux tubes, le taux d'hémolysine contrairement à celui à 100 %, où normalement on doit faire toute une série de dilutions entre un tube non hémolysé et le premier tube à hémolyse totale pour obtenir un titre assez précis.

Pour éviter cet inconvénient, on trace la courbe d'hémolyse. La portion moyenne comprise entre 30 % et 70 % d'hémolyse est pratiquement

une droite. Il est facile de déterminer par extrapolation graphique la valeur en unité 50 % en connaissant seulement deux points de la courbe entre 30 et 70 % d'hémolyse.

En pratique, on effectue une gamme de dilutions du simple au double sous un volume de 0, 5 ml.

Chaque tube renferme :

- 0, 5 ml de dilution en tampon de Mayer
- 0, 5 ml de complément dilué au 1/20ème
- 0, 5 ml de globules dilués au 1/10ème
- 1, 5 ml de tampon de Mayer : ces derniers ayant été ajoutés pour obtenir un volume suffisant pour la spectrophotométrie.

On porte 45 minutes au bain-Maris à 37°C.

On arrête la réaction au bain de glace.

On centrifuge, cinq minutes à 2000 tours par minute maximum sur centrifugeuse Suchet, qui peut recevoir un très grand nombre de tubes pour éliminer en culot les hématies non hémolysées.

On lit au spectrophotomètre à 540 mμ le surnageant des culots centrifugés, contre du tampon de Mayer.

On détermine l'hémolyse 50 % en laquant 0, 5 ml d'hématies au 1/10 ème et en diluant au demi.

On trace la partie de la courbe d'hémolyse à l'aide d'un point de plus forte hémolyse et d'un autre, de plus faible hémolyse que le 50 % précédemment déterminé.

On obtient le titre à l'intersection de l'horizontale à 50 % et de la courbe d'hémolyse précédente. Là encore, on doit multiplier le titre par deux, car ici on a également travaillé sur 0, 5 ml seulement.

Ainsi, en une seule opération, on a déterminé un titre hémolytique précis, permettant de calculer le rendement des opérations chimiques.

C / PREPARATION DE L'HEMOLYSINE.

Nous n'examinerons que le problème de l'hémolysine de lapin anti-mouton et laisserons de côté toutes les autres, qui ont été proposées (de cobaye, humaine, de porc, de cheval, etc...).

Il a été utilisé :

a) Des lapins assez jeunes, en bon état sanitaire, d'un poids moyen de 1,5 kg à 2 kg.

Pour éviter toute infection, on leur fait subir pendant deux jours, un traitement au chloramphénicol dissous dans l'eau de boisson, puis on les laisse quelque temps au repos.

b) Des hématies de mouton : prélevées sur de nombreux animaux, (en pratique une quinzaine) pour avoir toutes les chances statistiques que leur mélange renferme tous les groupes sanguins du mouton.

Les hématies sont conservées pendant toute la durée des immunisations en solution d'ALSEVER (11), qui permet une longue conservation sans hémolyse à + 4°C.

Quand on utilise le sang total de mouton, on procède au même mélange et on le conserve pur en flacon stérile à + 4°C.

I - ETUDE DE L'ANTICORPS EN FONCTION DE LA DUREE D'IMMUNISATION.

1) Conditions expérimentales.

Notre étude personnelle a été faite sur 12 lapins qui ont subi l'immunisation par le procédé utilisé par l'Institut Pasteur, pour préparer l'hémolysine qu'il commercialise.

Des ponctions ont été effectuées tout au cours de cette immunisation, le sérum obtenu a subi le traitement chimique décrit succinctement ci-après, car repris en détail dans un chapitre ultérieur, traitant de la chromatographie.

Alors qu'une partie du sérum est utilisée pure, simplement dialysée contre le tampon de départ de la chromatographie, l'autre a servi pour la préparation d'une globuline par précipitation au sulfate d'ammonium à demi-saturation, puis dialysée pour l'éliminer contre le tampon de départ de la chromatographie.

Ces deux produits, sérum et globuline, sont chromatographiés sur D.E.A.E. cellulose en colonne de 47 cm de hauteur et 1,5 cm de diamètre.

Le tableau n° 1 indique, en fonction du calendrier des prélèvements, la quantité de produit utilisée pour la chromatographie, la densité optique mesurée à 280 m μ d'où l'on déduit la densité optique totale du produit déposé sur la colonne. (Fig. I)

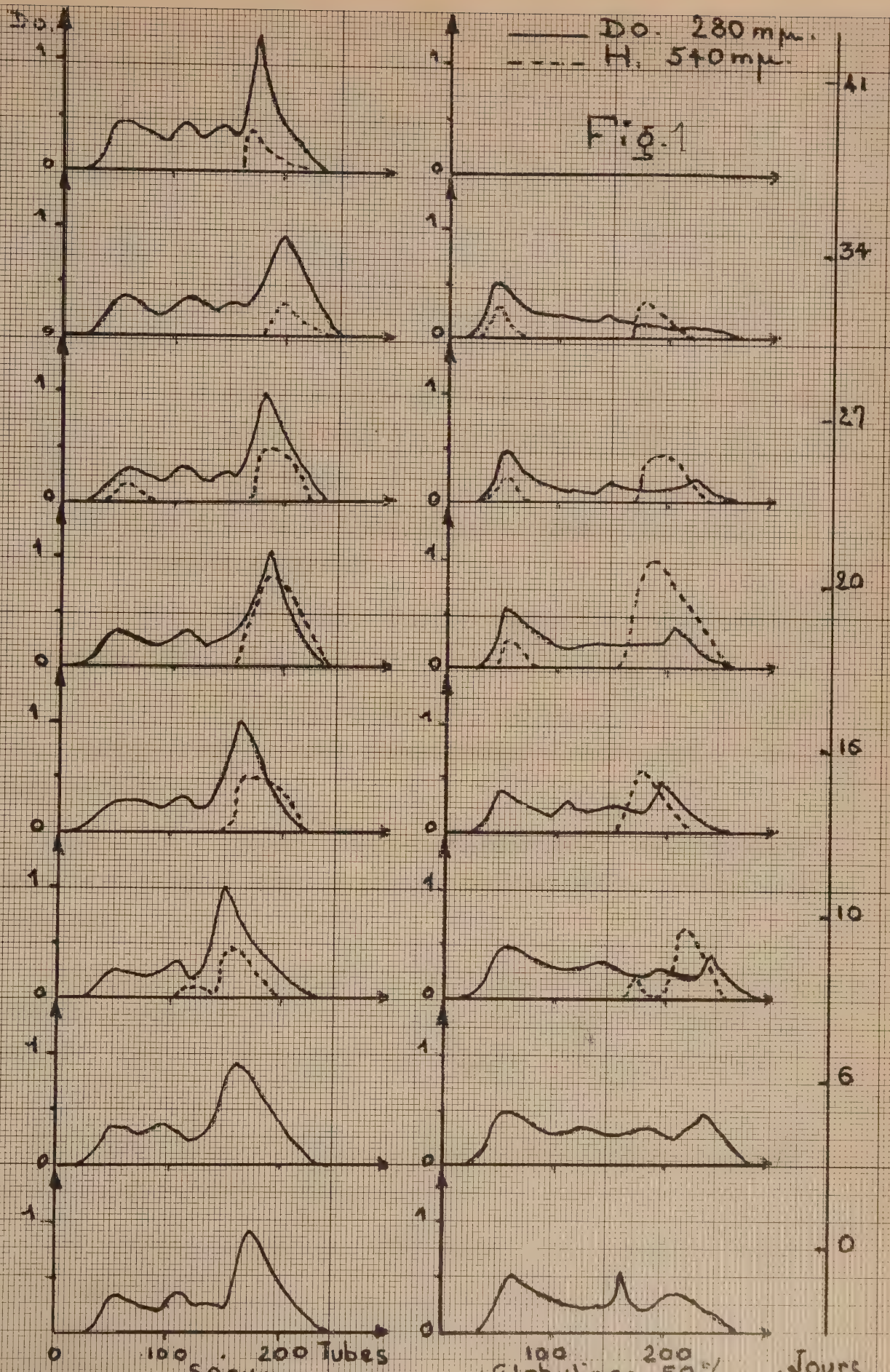
L'élution est effectuée avec un gradient réalisé avec les solutions suivantes :

- 500 ml de tampon Tris 0,001 M amené à pH 8,6 par de l'acide acétique
- 500 ml de tampon Tris 0,2 M amené à pH 8,6 par de l'acide acétique.

Les courbes sont tracées en densité optique à 280 m μ et en activité hémolytique.

TABLEAU N° I

Nombre de jours depuis le début de l'immunisation	Sérum en ml	Do 280	Do totale	Globuline en ml	Do 280	Do totale
Avant immunisation	7	47	329	10	28	280
6	9	39	351	9	24,5	220
10	7	43	301	8	24	192
16	8	43	344	8	26	208
20	7	45	315	8	27	216
27	7	42	294	8	22,5	180
34	7	40,5	283	8	22	176
41	7	40	280	8	22	176


Do.
1
0
——— Do. 280 mμ.
---- H. 540 mμ.
Fig. 1
41
34
27
20
16
10
6
0
0
100
200 Tubes
Sérum
100
200
Globulines 50 %
Jours.

2) Résultats.

L'ordre d'élution est le suivant :

- γ globulines,
- β globulines,
- α globulines, et, conjointement,
- Albumines (s'il s'agit du sérum total)
- Macroglobulines.

Les 7 S se trouvent avec les γglobulines, les 19 S dans les macroglobulines, soit respectivement dans le premier et le dernier pic de ce système chromatographique.

Notre travail portant sur les 19 S, c'est essentiellement ce pic qui a été suivi en courbe hémolytique.

On constate que l'importance de la surface délimitée par cette courbe, croît jusqu'au 20 ème jour environ, pour décroître ensuite lentement.

Le pic 7 S apparaît plus tardivement que le pic 19 S et continue à croître jusqu'à la fin de l'étude d'immunisation, même pendant la décroissance du pic 19 S.

On en tire la conclusion qu'il n'est pas utile de poursuivre l'immunisation au delà de 20 jours, la quantité d'hémolysine 19 S tendant ensuite à décroître.

Cette question a été traitée également par STELOS (12) qui a aussi utilisé la chromatographie sur D.E.A.E. cellulose, mais, selon SOBER (13) avec élution par des tampons successifs de molarité croissante et de pH décroissant.

Il a étudié un sérum d'immunisation récente (10 jours), longue (100 jours), et hyperimmunisé (200 jours).

Nos résultats concordent sensiblement avec les siens, puisqu'il constate que :

- Après 10 jours, le pic 7 S est à peine ébauché ; le pic 19 S est très important.
- Après 100 jours, le pic 7 S est plus important ; le pic 19 S reste important mais a diminué de moitié environ.
- Après 200 jours, le pic 7 S a encore augmenté ; le pic 19 S est devenu plus faible que le 7 S.

STELOS avait effectué la même étude par électrophorèse en gel d'amidon (14 - 15 - 16) selon KUNKEL (17).

Il est tout d'abord à noter que, dans ce dernier mode de séparation, les 7 S et les 19 S donnent deux bandes contigües très proches, aussi l'analyse des fractions hémolytiques peut conduire parfois à des pics qui se chevauchent partiellement, ce qui rend l'interprétation plus difficile que la chromatographie.

Toutefois, les résultats sont semblables à ceux obtenus par les divers modes de chromatographie sur D.E.A.E. cellulose.

On peut donc résumer cette étude en disant que l'hémolysine 19 S est un anticorps de formation précoce et très importante, mais décroissant assez vite, tandis que l'hémolysine 7 S se forme lentement, mais continue à croître longtemps.

II - ESSAIS DE PROCEDES D'IMMUNISATION.

Nous avons essayé deux systèmes d'immunisation :

- l'un par injections intra veineuses, selon TALMAGE (18)
- l'autre par sous-cutanées avec rappels intra veineux selon DARTER (19).

1) Procédé TALMAGE

Les injections sont uniquement intra veineuses ; elles ont lieu trois fois par semaine, pendant deux semaines.

La dose injectée est de 1 ml d'hématies de mouton, diluées à 10 % par kg de lapin.

TABLEAU D'IMMUNISATION

1er jour injection de 1 ml d'hématies à 10 % /par kg de lapin.

3ème " " " "

5ème " " " "

7ème " " " "

9ème " " " "

11ème " " " "

14ème " saignée

Les titres des sérums ainsi préparés sont les suivants :

- lapin n° 233 = 6.600 U.H. 50 % par ml
- " 234 = 9.100 " " "
- " 235 = 24.300 " " "
- " 236 = 23.700 " " "
- " 237 = 3.740 " " "
- " 238 = 10.700 " " "

On constate que des résultats acceptables n'ont été obtenus qu'avec deux lapins, sur six traités ; à savoir : 24.300 et 23.700 U.H. 50 %.

Trois ont donné un sérum de titre moyen et un n'avait pratiquement pas d'anticorps.

On n'a donc obtenu un résultat favorable que dans 33 % des cas, ce qui nous a fait abandonner ce procédé.

On doit cependant dire à sa défense, que cette expérience a été réalisée sur un lot trop faible d'animaux, pour être réellement concluante.

2) Procédé DARTER.

Il a démontré, dans la préparation du vaccin typhoïdique, que l'intra musculaire est un bon procédé d'immunisation.

Dans le cas de l'hémolysine, il procède à une série de sous-cutanées de sang total de mouton, suivie de deux rappels en intra veineuses pour obtenir un haut titre dans plus de 75 % des cas. Il n'est pas rare d'obtenir ainsi un titre de 48.000 unités au ml, ou plus, et la moyenne est de 20.000 unités.

Les sous-cutanées sont faites dans les flancs de l'animal, où elles provoquent fréquemment des abcès et les intra veineuses, dans la veine marginale de l'oreille. La désensibilisation est effectuée en injectant tout d'abord 1/4 de la dose, puis le reste après 30 à 45 minutes. On évite ainsi un grand nombre de chocs, souvent mortels.

TABLEAU D'IMMUNISATION

jour	Quantité en ml	Mode	Matériel
1er	0,5	sous-cutanée	sang total
3ème	1,0	"	"
5ème	1,5	"	"
7ème	2,0	"	"
9ème	2,5	"	"
12ème	1,0	intra veineuse	hématies lavées à 20 %
15ème	1,0	"	"
18ème		Saignée	

Les lapins sont saignés totalement par ponction cardiaque ; on obtient en moyenne 90 ml à 110 ml de sang par animal.

Le sang est mis à coaguler dans des flacons stériles, une heure à la température du laboratoire. Ensuite, on le porte deux heures à l'étuve à 37°C, puis deux heures à la chambre froide à + 4°C. On obtient ainsi une bonne exsudation du sérum, qui est facilitée en détachant le caillot des parois du vase avec un agitateur.

On centrifuge le sérum obtenu pour éliminer le culot de globules de lapin en suspension.

Par ces modes opératoires, on a obtenu en moyenne 50 ml de sérum par lapin, dont le titre en hémolyse 100 % est donné dans le tableau suivant :

N° du lapin	Titre U.H. 100 %
1	20.000
2	20.000
3	20.000
4	40.000
5	6.000
6	10.000
7	20.000
8	3.000
9	6.000
10	10.000
11	6.000
12	20.000
13	20.000
14	20.000
15	20.000
16	10.000
17	20.000
18	10.000

../..

../..

N° du lapin	Titre U.H. 100 %
19	40.000
20	10.000
21	20.000
22	20.000
23	20.000
24	20.000
25	10.000
26	50.000
27	40.000
28	20.000

On constate que, sur le lot de 28 lapins, 18 conduisent à un sérum de titre supérieur ou égal à 20.000 unités au ml, ce qui correspond à 64 % de très bonnes immunisations.

Quelques animaux du lot précédant n'avaient pas été saignés complètement et n'étaient pas morts ; cinq jours après le prélèvement, on leur a fait un rappel en injectant 5 ml de sang en sous-cutanée ; deux jours plus tard, un autre rappel en intra veineuse de 1 ml de globules à 20 % ; saignée trois jours après.

Dans les 2/3 des cas, le titre avait baissé par rapport à la récolte précédente, le plus souvent de moitié.

On en conclut que l'on a intérêt à prélever totalement chaque animal, car, réutilisé, il ne donne que de pauvais résultats.

Au cours de l'immunisation d'un autre lot, on a obtenu les résultats suivants :

N° du lapin	Titre U.H. 100 %
201	20.000
202	10.000
203	45.000

../..

../..

N° du lapin	Titre U.H. 100 %
204	20.000
205	20.000
206	20.000
207	45.000
209	10.000
210	20.000
211	20.000
212	20.000
213	20.000
215	45.000
216	20.000
217	10.000
218	20.000
220	20.000
221	20.000
222	20.000
223	10.000
224	45.000
225	10.000
226	6.000
227	10.000
228	10.000
229	20.000
230	10.000
231	6.000
232	20.000

Sur ce lot de 29 animaux, 19 ont donné un sérum de titre supérieur ou égal à 20.000 unités, soit 65 % de très bonne immunisation. Ce chiffre est pratiquement le même que celui de 64 % obtenu dans l'expérience précédente, mais diffère sensiblement des 75 % indiqués par DARTER.

On a réuni les 19 sérums de titre supérieur ou égal à 20.000 U. H. 100% et le dosage du mélange montre qu'il titre 26.000 U.H. 50 % par ml.

Le titre du mélange des autres sérums est de 8.650 U.H. 50 % par ml. La réunion des deux lots donne 20.000 U.H. 50 % par ml, ce qui est en accord avec Darter et explique que, par la suite, nous n'ayons plus trié les sérums un à un, mais fait un lot total directement.

La dernière immunisation que nous avons effectuée, a porté sur 24 lapins, de poids beaucoup plus lourd que les précédents : en moyenne, supérieur à 3 kg ; ce qui a conduit à doubler les doses injectées. Il est à remarquer que le lot était très homogène et en excellent état sanitaire.

La technique de désensibilisation pour les intra veineuses a été modifiée et réalisée comme suit :

On a posé une pince à artère sur la veine marginale de l'oreille et on a injecté dedans les globules assez lentement ; ainsi, ils passent, de ce fait, par les vaisseaux collatéraux et ne rentrent que lentement dans la circulation. Ceci a évité la double injection précédemment pratiquée.

Le mélange de sérums ainsi rassemblés titre 30.400 U.H. 50 %, chiffre très élevé, probablement dû à la bonne qualité des lapins et également au doublement de la dose injectée, celle préconisée par Darter étant peut-être un peu faible.

D / CONSERVATION DE L'HEMOLYSINE.

On utilise, le plus généralement, pour la conservation du sérum hémolytique, la dilution au demi dans la glycérine neutre.

Si cette solution donne de très bons résultats en sérologie, il n'en va pas de même si l'on désire effectuer un traitement chimique du produit.

Nous avons successivement utilisé deux moyens :

I - LA CONGELATION.

En récipient stérile conservé en chambre à - 30°C, le titre sérologique se conserve très bien, même après plus d'un an.

Mais les protides subissent une certaine dénaturation par formation d'un insoluble, même à 37°C, qui est gênant et qui contient une certaine quantité d'anticorps qui ne peut être récupérée.

Aussi avons-nous abandonné ce procédé, bien qu'il soit le plus commode pour éviter les pollutions.

II - EMPLOI D'UN CONSERVATEUR CHIMIQUE.

Nous avons essayé l'Ethyl-thiosalicylate double de sodium et de mercure, appelé communément Merthiolate, qui est utilisé comme conservateur protéinique (20).

Pour vérifier l'innocuité du Merthiolate à une dilution de 1/10.000 sur l'hémolysine, on a préparé une solution à 1/5.000 que l'on a diluée au 1/2 avec un sérum hémolytique ; ce qui a donné une hémolysine à 1/10.000 de Merthiolate.

On a préparé un témoin en diluant au 1/2 du sérum hémolytique dans de l'eau physiologique que l'on a conservé à - 30°C pendant l'expérience.

La solution d'hémolysine au Merthiolate a été divisée en deux :

- une partie conservée à + 4°C

- une partie conservée à + 20°C.

On titre au bout de 48 heures de contact.

Résultats : Témoin : 3.200 U.H. 50 % par ml

Fraction à + 4°C : 3.150 U.H. 50 % par ml

Fraction à + 20°C : 2.600 U.H. 50 % par ml

On constate qu'à + 20°C on n'a conservé que 81 % de l'hémolysine initiale, tandis qu'à + 4°C, le titre, aux erreurs expérimentales près, est resté le même.

Pour cette raison, nous avons, tout au long de notre travail, conservé à + 4°C l'hémolysine préalablement additionnée de 1/10.000 de Merthiolate.

Le sérum est toujours resté limpide, sans trace de fermentation et son titre est demeuré stable.

E / RESISTANCE DE L'HEMOLYSINE.

Pour la suite de nos essais, il nous a fallu étudier la résistance de l'hémolysine en fonction des variations du pH et de la température du milieu.

I - RESISTANCE EN FONCTION DES VARIATIONS DE pH.

Elle a été examinée entre pH 2 et pH 12 en préparant 11 tubes variant entre eux d'une unité de pH et ce, en utilisant le tampon de Britton et Robinson (21), obtenu par mélange de deux solutions.

a) Solution acide de formule :

H_3PO_4	0,04 M	= 3,92 g %
CH_3 COOH	0,04 M	= 2,40 g %
Acide borique	0,04 M	= 2,48 g %

b) Solution alcaline : Soude 0,2 N

Le pH recherché étant obtenu par addition à 10 ml de la solution acide du nombre de ml de soude ci-après :

pH 2	0,7 ml	pH 7	5,25 ml
pH 3	1,8 ml	pH 8	6,05 ml
pH 4	2,4 ml	pH 9	6,8 ml
pH 5	3,5 ml	pH 10	7,75 ml
pH 6	4,2 ml	pH 11	8,3 ml
		pH 12	10 ml

Chaque tube renferme 0,9 ml de chaque tampon et 0,1 ml d'une dilution de sérum hémolytique en eau physiologique.

Nous avons vérifié,en particulier sur les tubes extrêmes, que le pouvoir tampon naturel du sérum ainsi dilué ne modifiait pas le pH.

Pour la détermination de la résistance, les tubes ont été portés une heure à 37°C, puis 24 heures à + 4°C et titrés comme suit :

A 0,1 ml des solutions précédentes, on ajoute 0,9 ml de tampon de

Mayer qui ramène le pH au voisinage de la neutralité.

Les titres sont les suivants :

pH 2	10	U.H. 50 %
pH 3	832	"
pH 4	896	"
pH 6	960	"
pH 7	1210	"
pH 8	1210	"
pH 9	640	"
pH 10	576	"
pH 11	528	"
pH 12	496	"

(Fig. : 2)

De la courbe précédente, on déduit :

a) L'activité optimale se situe entre pH 7 et pH 8.

b) Le milieu acide est moins dénaturant que le milieu alcalin.

c) A pH inférieur à 3, la dénaturation est quasi totale, probablement due à une précipitation irréversible de la protéine.

II - RESISTANCE A LA TEMPERATURE.

L'hémolysine, tout en perdant de l'activité, agit encore, comme le montrent les résultats précédents, aux pH 4 et 12 ; aussi, la résistance à 56°C a été déterminée à ces pH extrêmes.

On prépare une série de tubes à chacun de ces pH à l'aide du tampon de Britton - Robinson.

On ajoute à chacun, une quantité égale d'hémolysine (310 U.H. 50 %)

On les porte au bain-Marie à 56°C et on les retire successivement à 5 minutes d'intervalle.

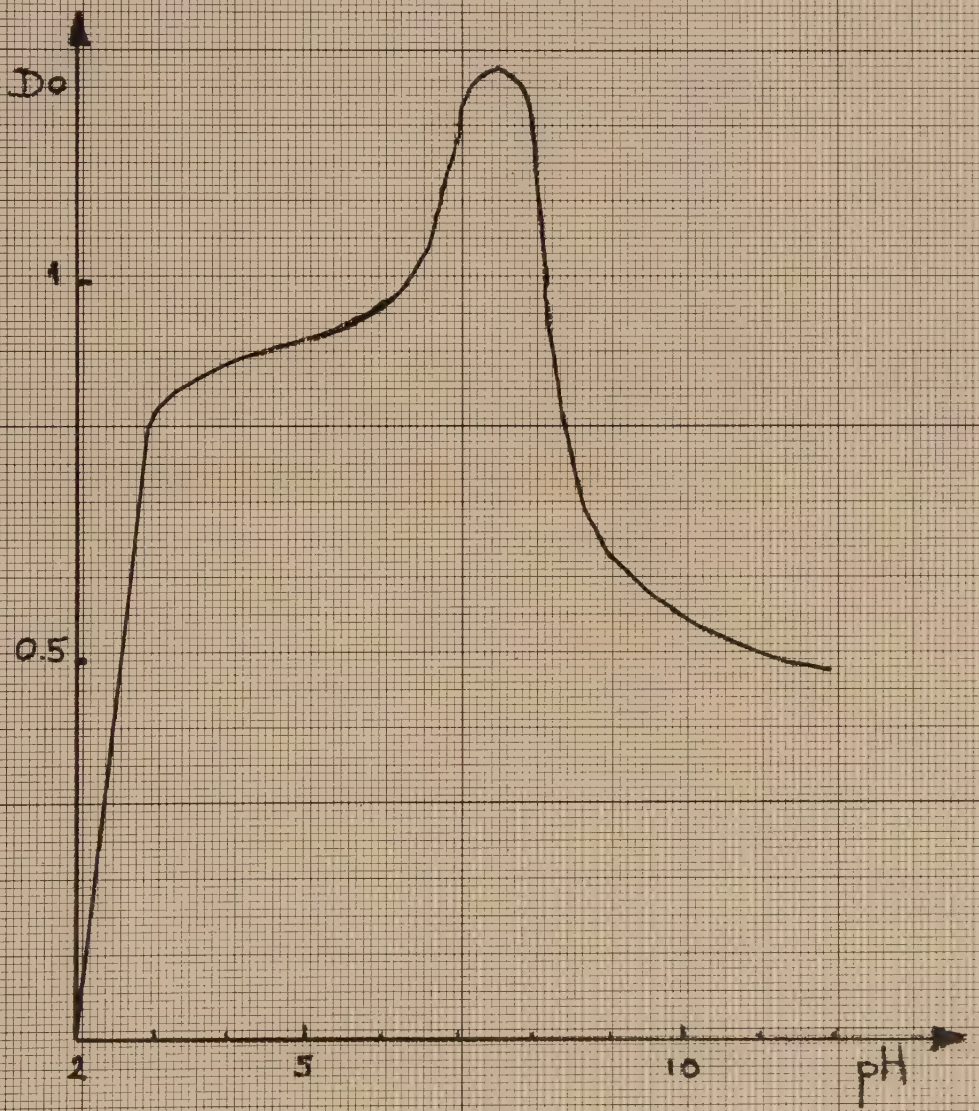


Fig. 2

Le titrage du contenu de chaque tube réalisé comme précédemment par le mélange de 0,1 ml de cette solution avec 0,9 ml de tampon de Mayer, donne les résultats suivants :

Temps en minutes	pH 4	pH 12
0	310 U.H. 50 %	310 U.H. 50 %
5	240 "	15 "
10	124 "	2 "
15	112 "	0 "
20	56 "	
25	/ "	
30	24 "	
35	14 "	

La destruction est presque instantanée à pH 12 et à 56°C ; Elle est rapide à pH 4 et à la même température, ce qui ne permet pas l'usage de cette température à des pH extrêmes.

F / ESSAIS DE PURIFICATION BIOLOGIQUE DE L'ANTICORPS.

Des essais de purification biologique ont été effectués depuis longtemps pour obtenir une hémolysine pure par fixation spécifique sur hématies ou stromas suivie d'élution.

KOSAKAI (22), le premier, agglutina des hématies au sérum hémolytique et réalisa l'élution d'hémolysine à l'aide d'une solution de saccharose et appela ce procédé "méthode spécifique" de purification.

NAIN et HIRSCH (23), préparèrent des hématies sensibilisées, les lavèrent à l'éther, puis firent une extraction avec de l'acide dilué, pour obtenir l'hémolysine.

Cependant, ces procédés ont le défaut de donner parallèlement de l'hémoglobine lors de l'hémolyse , que peuvent subir certaines hématies. Aussi, leur préfère-t-on la méthode aux stromas.

I - PREPARATION DES STROMAS (8)

On met en oeuvre 200 ml de culot d'hématies lavées de mouton, que l'on congèle et décongèle trois fois à - 30°C et + 37°C.

Pour les laquer, ce produit étant trop visqueux, on le dilue au 1/3 avec de l'eau distillée.

On émulsionne avec de l'éther le produit précédent.

On centrifuge 10 minutes à 3000 g en centrifugeuse refroidie.

Dans chaque tube se forment trois couches : La couche supérieure contient l'éther, la couche inférieure est une solution d'hémoglobine et, à l'interphase, se trouve une couche solide formée de stromas.

On les rassemble et les lave trois fois à l'eau distillée, en centrifugeant et en conservant le culot.

Après la troisième fois, le surnageant n'est plus rouge et le culot a une teinte grise.

Ce culot est remis en suspension dans de l'eau physiologique et amené à 100 ml.

Sa conservation à - 30°C pendant plus d'un mois n'a pas diminué son activité.

II - FIXATION DE L'HEMOLYSINE SUR STROMAS.

De très nombreux anticorps se fixent sur stromas (24).

Dans le cas de l'hémolysine, la fixation est totale, ce qui a permis à HEIDELBERGER (25) d'utiliser ce procédé pour titrer le corps:

Il fixe l'hémolysine sur stromas deux heures à la température du laboratoire, puis une nuit au bain de glace. Il traite de la même façon un témoin sans hémolysine. Après trois lavages à l'eau physiologique, il dose l'azote par micro-Kjeldahl.

La teneur en azote de l'anticorps est la différence entre celle des stromas avec l'hémolysine et celle du témoin.

Dans notre étude, nous avons cherché à saturer les stromas tout en ayant le moins possible de perte d'hémolysine dans le surnageant.

Dans un premier essai on a utilisé 24 ml de sérum hémolytique, titrant 8.000 U.H. 50 % par ml, soit 192.000 unités que l'on a mélangé à 20 ml de la suspension de stromas précédente.

On porte 45 minutes à 37°C.

On centrifuge pour séparer le surnageant qui renferme au total 6.100 U.H. 50 %.

Le pourcentage de fixation est de 97 %.

Dans un deuxième essai, on a utilisé 5 ml de sérum hémolytique de titre 20.000 U.H. 50 % par ml, que l'on a mis en contact avec 10 ml des mêmes stromas que précédemment, une heure à 37°C puis 24 heures à 4°C.

On centrifuge et le surnageant renferme 7.300 U.H. 50 % sur 100.000 utilisées, ce qui donne une fixation de 93 %.

Dans ce dernier essai, la fixation n'étant pas totale, on est sûr de la saturation des stromas. Ce sont des produits préparés dans les mêmes conditions qui seront ensuite utilisés pour les essais d'élution.

III - ELUTION DE L'HEMOLYSINE FIXEE SUR STROMAS.

EULER (26) utilisa la glycérine comme éluant ; mais cette substance rend difficile les manipulations chimiques.

KLEINE (27) utilisa la chaleur : 3 heures à 37°C : les résultats sont très faibles.

WEINER (28), quant à lui, précipita l'anticorps à l'alcool refroidi à - 6°C puis porta au grand froid, (30 à 60 minutes suffisent). Il sépara par centrifugation ; il incuba à 37°C le précipité 30 à 60 minutes pour remettre en solution l'anticorps. Le rendement est faible, car la dénaturation est assez importante.

Nous avons essayé l'élution en tenant compte des connaissances acquises lors de nos précédentes mesures de résistance de l'hémolysine, en fonction des variations du pH et de la température.

1) En milieu acide :

On s'est servi du tampon de WALPOLE (29) (30), dix fois plus concentré qu'à l'habitude et qui, pour pH 4, est constitué par le mélange de :

- 82 ml d'acide acétique 1 M
- 18 ml d'acétate de sodium 1 M

On fait agir pendant 10 minutes à 37°C, 25 ml du tampon précédent sur une suspension de stromas saturée par 190.000 U.H. 50 %.

On centrifuge immédiatement et le surnageant renferme 6.250 U.H. 50 %.

Le rendement de l'élution est donc de 3,2 %, ce qui est négligeable.

Afin de déterminer si la haute molarité du tampon utilisé, ou l'ion acétate agissait comme inhibiteur, on a substitué le tampon de Britton-Robinson à celui de Walpole.

On utilise une suspension de stromas saturés par 100.000 U.H. 50 % à laquelle on ajoute 10 ml de tampon de Britton -Robinson à pH 3, 5.

On porte une heure au bain-Maris à 37°C en agitant fréquemment.

En fin d'expérience, on filtre le mélange pour avoir une meilleure séparation que par centrifugation ; celle-ci étant assez difficile, car les stromas sont de très petites particules à comportement colloïdal.

Le titrage du filtrat neutralisé, montre qu'il renferme 8.000 U.H. 50 %, c'est-à-dire un rendement de 8 %.

Bien que ce dernier rendement soit meilleur que le précédent, il est cependant bien trop faible pour être utilisé pour une purification importante.

2) <u>En milieu alcalin</u> :

On utilise aussi le tampon de Britton - Robinson, mais à pH 12.

Comme précédemment, on part d'une suspension de stromas, saturée par 100. 000U.H. 50 % que l'on traite une heure à 37°C par 10 ml de tampon.

On filtre et titre.

Ce filtrat renferme 59.000 U.H. 50 %, ce qui donne un rendement de 59 %. Ce résultat est assez bon.

Cependant, si on se reporte à la courbe de résistance de l'hémolysine en fonction du pH, on constate qu'à pH 12, le titre est sensiblement moitié moindre qu'à pH 7.

Le rendement d'élution est donc proche, dans ces conditions, du maximum possible.

- Etude du coefficient de purification dans les conditions de préparation précédentes.

Pour une évaluation rapide d'azote protidique, tout en conservant la solution utilisée pour d'autres manipulations, on multiplie la dansité optique à 280 mμ par le coefficient de 0,1248 (31).

On obtient ainsi le nombre de mg N par ml.

a) Sérum de départ : Do : 77,5 Titre 20.000 U.H. 50 %

77,5 x 0,1248 = 9,672 mg N/ml

$$\frac{20.000 \text{ U.H. } 50\ \%}{9,672} \neq 2.000 \text{ U.H. } 50\ \% \text{ / mg N}$$

b) Produit d'élution : Do : 4,50 Titre 5.900 U.H. 50 %

4,50 x 0,1248 = 0,56 mg N/ml

$$\frac{5.900}{0,56} \neq 10.500 \text{ U.H. } 50\ \% \text{ / mg N}$$

Coefficient de purification : $\frac{10.500}{2.000} = \underline{5,2}$

Ce coefficient n'est pas très élevé et nous avons, de ce fait, abandonné ce procédé pour une préparation de quantité importante d'hémolysine.

Ceci semble dû à une dissolution de protides de stromas par le liquide alcalin. On élue donc non seulement l'hémolysine fixée, mais aussi ces protides et le problème précédent d'élimination des protides sériques se repose pour éliminer ces protides de stromas.

o0o

DEUXIEME PARTIE

ESSAIS DE DIVERS PROCEDES DE PURIFICATION PHYSIQUES ET CHIMIQUES.

Parmi les diverses méthodes proposées pour la purification de l'hémolysine, nous recherchons celles qui, tout en permettant d'obtenir un coefficient de purification élevé avec le meilleur rendement possible, conduisent à la préparation d'une quantité suffisante pour l'exécution des divers travaux analytiques.

Nous examinons successivement :

- l'électrophorèse préparative,
- la précipitation des globulines par le sulfate de sodium ou le sulfate d'ammonium,
- l'ultra-centrifugation,
- l'intérêt de la séparation de l'euglobuline,
- la concentration des fractions protéiques par ultra-filtre,
- la séparation des protéines par diverses méthodes chromatographiques telles qu'absorption sur phosphate de calcium, échange d'ions sur carboxyméthylcellulose ou diéthylamino-éthyl cellulose et filtration sur gel de Séphadex G 200.

A / ELECTROPHORESE PREPARATIVE.

De nombreux auteurs ont utilisé ce procédé non seulement pour l'analyse mais aussi pour préparer une hémolysine purifiée.

Les premières électrophorèses de sérum hémolytique furent réalisées par GIRARD (32), qui en tira la conclusion que l'hémolysine est un "grain de matière" (nous dirions molécule), porteur de la propriété anticorps, et que sa mobilité est faible en électrophorèse.

Par la suite, on utilisa deux modes d'électrophorèse, l'un en phase liquide selon TISELIUS, l'autre sur support solide du type gels.

I - ELECTROPHORESE DE TISELIUS

STELOS (33) effectua l'électrophorèse en cellule de 11 ml sur 5 ml de sérum hémolytique.

Ce procédé est essentiellement analytique.

II - ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR GEL D'AMIDON

A la différence du précédent, ce procédé très pratique, permet l'obtention d'un produit purifié en une seule opération.

Toutes les techniques mises en oeuvre, sont dérivées de celle de KUNKEL(34). qui employait de grands blocs de gel d'amidon de pomme de terre dans lesquels il découpait un parallélépipède pour y couler le mélange de gel et de sérum à faire migrer.

STELOS (33) (35) (14) utilisa ce procédé pour traiter l'hémolysine : les échantillons varient de 100 à 200 mg de protéines.

La migration se fait à + 5°C sous 300 volts et 30 m-Ampères pendant 48 heures. A la fin, on découpe le bloc en fragments d'égale largeur que l'on élue dans le tampon Véronal à pH 8,6. On analyse chaque fraction du point de vue teneur en protide et hémolysine. On obtient les deux hémolysines γglobuline et macroglobuline signalées dans un chapitre précédent (16), et également appelées γ1 et γ2 globulines.

KOYAMA (7) utilisa un procédé similaire sur des quantités de sérum plus importantes que celles employées par STELOS, mais qui conduisent cependant à une quantité d'hémolysine purifiée, insuffisante pour se prêter à l'analyse chimique.

C'est pour cette raison que nous n'avons pas utilisé ce procédé, malgré son intérêt et sa simplicité.

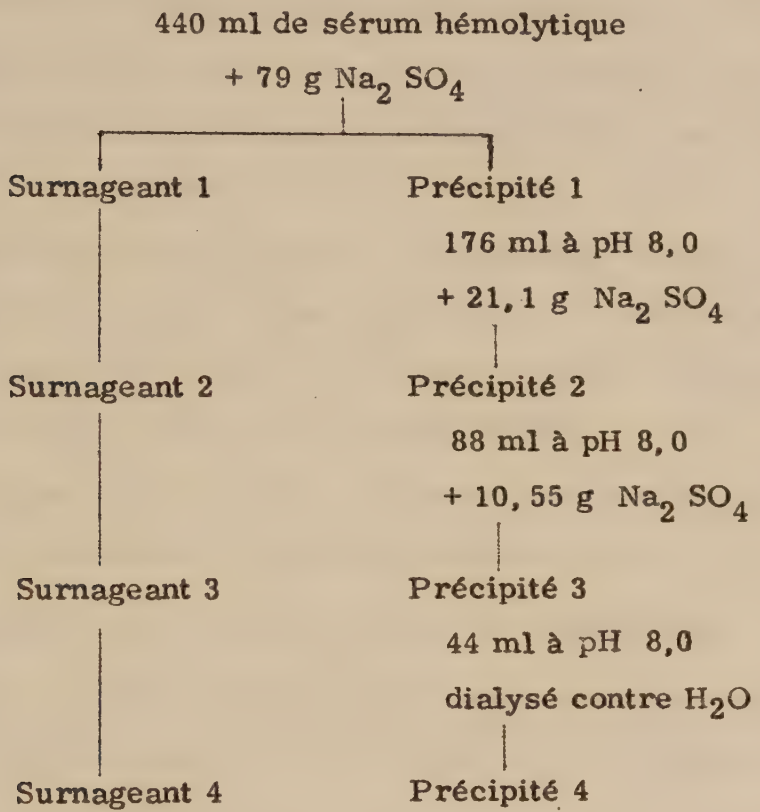
B / PRECIPITATION DES GLOBULINES

Cette méthode de séparation est basée sur la propriété des sulfates de métaux alcalins de précipiter les globulines.

$Na_2 SO_4$ et $(NH_4)_2 SO_4$ ont été utilisés dans le cas de l'hémolysine.

I - PRECIPITATION AU SULFATE DE SODIUM

AMIRAIAN (36) effectua une précipitation fractionnée par des quantités croissantes de $Na_2 SO_4$ selon la méthode de KEKWICK (37) qu'il appliqua comme suit :



Ce qui, en activité hémolytique, lui donna les résultats suivants :

Fraction	Activité totale	Activité spécifique (unité mg de tyrosine)
Sérum d'origine	8.150.000	3.400
Surnageant 1	2.750.000	2.400
Surnageant 2	2.930.000	25.700
Surnageant 3	260.000	7.300
Surnageant 4	120.000	2.300
Précipité 4	140.000	6.000

Ainsi, il sépara une hémolysine assez concentrée et pure.

Notre but n'étant pas d'obtenir le corps par précipitation, mais seulement de se débarrasser des protides de poids moléculaire les plus légers, nous n'avons pas utilisé cette technique qui constitue une préparation et qui, pour nous, n'est que le prélude à d'autres purifications chimiques.

II - PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM (38)

Ce sel est le plus couramment employé pour l'hémolysine.

STELOS (33) (35) l'utilisa à la concentration 2 M, soit environ 26 %.

Pour notre part, nous avons, comme KOYAMA (39), effectué la précipitation par une solution à 50 % de saturation, soit à 350 g de $(NH_4)_2 SO_4$ par litre de solution à 20°C.

Pour obtenir une meilleure précipitation, on dilue au préalable le sérum au 1/5ème avec de l'eau physiologique et l'additionne d'un égal volume d'une solution saturée et filtrée de sulfate d'ammonium, le mélange se faisant lentement sous agitation magnétique. .

On laisse la précipitation s'effectuer 24 heures à la température du laboratoire ; le précipité décante pendant ce temps.

On élimine le surnageant limpide par aspiration.

On homogénéise la couche inférieure et on la centrifuge 20 minutes en pots de 250 ml à 14.000 tours/minute en centrifugeuse réfrigérée "International".

On recueille le précipité, on le remet en suspension dans une solution de sulfate d'ammonium à demi-saturation pour le laver et on centrifuge à nouveau.

Ce précipité est mis en sac de cellophane pour être dialysé.

Etant donné sa très haute teneur en sel, on le dialyse tout d'abord contre une solution 0, 5 M de NaCl pour éviter l'éclatement du sac de dialyse. Puis ensuite contre le tampon qui sera utilisé dans l'opération chimique suivante :

On poursuit la dialyse jusqu'à élimination complète de l'ion SO_4^{2-} du liquide de dialyse, ce qui est suivi par l'essai de précipitation par le $BaCl_2$ en milieu chlorhydrique.

Rendement en hémolysine : en partant de 1.445 ml de sérum titrant 20.000 U.H. 50 % soit environ 30×10^6 unités, on obtient 400 ml de globulines titrant 77.200 U.H. 50 % par ml, soit un rendement de 100 %.

D'autres expériences nous ont donné un rendement très voisin.

- Etude de la purification dans les conditions précédentes de travail.

a) Sérum initial

Titre 15.000 U.H. 50 % par ml

Densité optique à 280 m : 58

soit 58 x 0,1248 = 7,24 mg N

$\frac{\text{unités}}{\text{mg N}}$ = 2.070

b) Globuline 50 %

Titre 35.000 U.H. 50 % par ml

Densité optique à 280 m : 90

soit 90 x 0,1248 = 11,23 mg N

$\frac{\text{unités}}{\text{mg N}}$ = 3.115

Le coefficient de purification est donc de 1,50 ; bien qu'assez faible, il permet de se débarrasser de la plus grande partie des albumines, d'où son réel intérêt.

La précipitation par le sulfate d'ammonium présente un autre avantage, car elle permet d'obtenir une solution plus concentrée en protéines que celle du sérum de départ : en effet, à partir de 1.445 ml de sérum hémolytique, on obtient, avec un rendement en hémolysine voisin de 100 %, 400 ml d'une solution de globuline, la concentration de cette dernière est donc environ trois fois plus élevée que celle de départ.

C / ESSAI DE PURIFICATION PAR ULTRA-CONTRIFUGATION PREPARATIVE.

Depuis PAIC (2) on sait que l'hémolysine est une macro-molécule. Cette propriété a été utilisée par STELOS (15) pour la concentrer par ultra-centrifugation à 105.000 g pendant quatre heures.

Dans nos essais, nous avons utilisé la centrifugeuse Spinco, modèle L, munie du rotor 40 qui porte 12 tubes en nitrate de cellulose de 12 ml chacun.

On l'a fait tourner à 36.000 tours/minute pendant cinq heures, l'appareil étant refroidi à 4°C.

On obtient l'accélération suivante (40) :

- 55.000 g au haut du tube
- 85.000 g au milieu "
- 117.000 g au fond "

On a empli chaque tube avec de la globuline 50 % préparée dans un chapitre précédent.

Après centrifugation on a séparé le liquide surnageant du culot ; ce liquide étant lui-même fractionné en quatre parties, on a donc :

- Fraction 1 : le quart supérieur du liquide
- Fraction 2 : le quart sous fraction 1
- Fraction 3 : " " " " " 2
- Fraction 4 : " " " " " 3
- Fraction 5 : le culot transparent.

Ce culot est remis en solution dans de l'eau physiologique. Sur chaque fraction on mesure la densité optique à 280 mμ et le titre hémolytique d'où l'on déduit le coefficient de purification.

Résultats

a) Fraction 1 : Do = 58,5

Titre : 12.400 U.H. 50 % par ml

58,5 x 0,1248 = 7,30 mg N par ml

$\frac{12.400}{7,30}$ = 1.700 U.H. 50 % /mg N

b) Fraction 2 : Do = 105

Titre : 26.400 U.H. 50 % par ml

105 x 0,1248 = 13,1 mg N par ml

$\frac{26.400}{13,1}$ = 2.010 U.H. 50 % /mg N

c) Fraction 3 : Do = 127,5

Titre : 45.400 U.H. 50 % par ml

127,5 x 0,1248 = 15,9 mg N par ml

$\frac{45.400}{15,9}$ = 2.850 U.H. 50 % /mg N

d) Fraction 4 : Do = 276

Titre : 49.600 U.H. 50 % par ml

276 x 0,1248 = 34,4 mg N par ml

$\frac{49.600}{34,4}$ = 1.440 U.H. 50 % /mg N

e) Fraction 5 :: Do = 129,2

Titre : 48.800 U.H. 50 % par ml

129,2 x 0,1248 = 16,1 mg N par ml

$\frac{48.800}{16,1}$ = 3.030 U.H. 50 % /mg N

Sachant que le sérum de départ titrait 2.000 U.H. 50 % /mg N, la purification est de $\frac{3.000}{2.000}$ = 1,5 .

On constate donc que :

- La densité optique et, par suite, la concentration en protéines, croît du haut au fond du tube, que ce soit pour le liquide ou le culot (qui a été dilué avant mesure).

- Le titre augmente dans le même sens, et la purification également, à l'exception de la fraction 4.

  La purification est néanmoins insuffisante ; les protides ont été centrifugés en bloc sans la séparation recherchée 7 S, 19 S.

Ce mode opératoire n'a donc pas été retenu et nous verrons par la suite que la centrifugation en gradient nous permettra d'atteindre ce résultat.

D / SEPARATION DE L'EUGLOBULINE.

L'euglobuline est facile à précipiter ; aussi semble-t-il avantageux de l'éliminer, ce qui devrait faciliter les purifications ultérieures du produit.

Pour précipiter ce protide, nous avons mis en oeuvre les procédés utilisés par la sérologie pour la préparation du "chaînon moyen" à partir des sérums de cobaye ou humain.

Suivant FERRATA (41) ou des publications plus récentes (42) (43), on peut procéder par dilution ou par dialyse.

Nous laisserons de côté le procédé par dilution de CO_2 (44).

Dans les deux méthodes examinées, la solution précipitante est du phosphate mono-potassique 0,02 M, amené à pH 5,4 et qui est obtenue à partir de :

$KH_2 PO_4$	0,5 M	153 ml
KOH	N	1,73 ml
Eau distillée	q.s.p.	4 litres

LEPOW (45) utilise dans le même but du tampon acétate de pH 5,5, sensiblement voisin et de même force ionique 0,02 M.

I - PRECIPITATION PAR DILUTION.

A 10 volumes de la solution phosphate précédente, refroidie, on ajoute lentement, sous agitation magnétique, 1 volume de sérum, en chambre froide.

On laisse 20 à 30 minutes au froid en agitant constamment.

Puis, on centrifuge pour obtenir en culot l'euglobuline ou "châinon moyen". On le lave et le rassemble à nouveau par centrifugation.

Le surnageant est ramené à l'isotonie et pH 7,0 pour éviter sa dénaturation.

Cette méthode, bien que plus rapide que la suivante, a dû être abandonnée, car la fraction recherchée se trouve en solution diluée 10 fois, ce qui nécessite une concentration ultérieure.

II - PRECIPITATION PAR DIALYSE.

Le sérum est placé dans un sac de cellophane et dialysé 24 heures au froid contre la même solution de phosphate. On compte 15 ml de sérum contre 4 litres de solution.

Si l'on veut dépasser cette quantité de sérum, on doit renouveler la solution de dialyse.

BIER (46) réduit la durée à 6 heures, en augmentant la surface de contact en plaçant dans le sac un tube de verre bouché, ce qui ramène le volume de 15 à 5 ml.

Personnellement, nous avons dialysé pendant 48 heures en renouvelant le liquide de dialyse en raison de la grande quantité de globulines 50 % ainsi traitées.

Après précipitation, on centrifuge pour obtenir le précipité. On le lave pour bien en retirer l'hémolysine incluse dans le précipité.

Le surnageant contenant l'hémolysine est ramené à pH 7,0 et à l'isotonie par dialyse.

On solubilise par ailleurs le précipité dans une solution extemporanée de bicarbonate de sodium et de chlorure de sodium.

III - RESULTATS.

On part d'une globuline 50 % titrant 1.000.000 U.H. 50 %,

On obtient :

a) Le surnageant : 32 ml de titre 16.000 U.H. 50 % par ml, soit 512.000 U.H. 50 %

b) Le précipité : 20 ml de titre 4.000 U.H. 50 % par ml, soit 80.000 U.H. 50 %.

On récupère au total 592.000 U.H. 50 %

Le précipité en représente donc 13, 5 %
Le surnageant " " " " " 86, 5 %

Ce qui est un assez bon rendement pour une opération chimique, si l'on considère les 86, 5 %.

Toutefois, le rendement total n'étant que de 59 %, la fraction intéressante ne représente que 51 % de l'hémolysine de départ.

Nous avons donc également abandonné cette méthode par suite de son faible rendement, dû peut-être à une dénaturation provoquée par le pH acide ou à la trop faible molarité de la solution précipitante.

E / METHODE DE CONCENTRATION PAR ULTRAFILTRES

Au cours des manipulations et spécialement après les chromatographies, il est nécéssaire de concentrer des fractions protidiques dont la faible teneur est diluée dans de grands volumes.

L'ultrafiltration est une méthode de choix pour arriver à ce résultat.

Elle présente les avantages suivants :

a) Les protéines ne sont pas altérées ; le processus de filtration est doux et peut se faire à 4°C.

b) Le pH est stable : en effet, la concentration saline de la solution n'est pas modifiée par la filtration. Donc, la composition ionique, par conséquent le pH, ne varie pas.

c) Le risque de contamination est minime.

d) L'appareillage est d'un encombrement minime.

e) De hautes concentrations peuvent être atteintes.

On peut en effet travailler sur des volumes très faibles, les membranes filtrantes étant étanches à l'air, même partiellement immergées dans la solution.

f) La durée de filtration n'est pas très importante. Elle est fonction de la viscosité du milieu ; donc augmente en fin d'expérience.

Pour ultrafiltrer, nous avons utilisé deux procédés :

I - ULTRAFILTRE L K B (47)

Il se compose essentiellement d'un chassis support en nylon tressé, recouvert d'un boyau de dialyse en forme de sac. L'étanchéité est assurée à la partie supérieure par un anneau de caoutchouc et à la partie inférieure par un double noeud sur le boyau de cellophane.

La partie supérieure est obturée par un bouchon traversé par une tige d'aspiration par laquelle on fait un vide de 10 à 15 mm de Hg.

La membrane de cellulose a des pores de rayon moyen de 24 Å qui ne laissent passer que les corps de masse moléculaire inférieure à 30.000 et donc arrête les protéines.

La difficulté du montage de l'appareil nous a fait renoncer à son utilisation au profit de la méthode suivante :

II - FILTRE A MEMBRANE DE COLLODION

Nous avons utilisé la technique de RAMSHORST (48).

Des bougies de verre fritté de grain moyen ont servi de support à la membrane filtrante.

Préparation de l'ultrafiltre :

a) La bougie propre et sèche est plongée dans l'acide acétique jusqu'à imprégnation complète.

b) On la plonge dans la solution de collodion et on l'y maintient environ une minute. On utilise de Parlodion fabriqué par Mallinckrodt à une concentration de 8 % dans l'acide acétique. La solution se fait en agitant 3 jours environ, à 37°C, le Parlodion dans l'acide en récipient clos.

c) On retire du bain et attend que l'excès de Parlodion soit égoutté, on tourne la bougie de façon à obtenir une couche uniforme. Le filtre est alors plongé dans de l'eau préalablement portée à 30°C. On laisse 5 heures à cette température pour coaguler le Parlodion.

On doit faire attention à ce que l'eau ne pénètre pas dans la bougie à ce stade de la préparation.

d) On lave les filtres à l'eau distillée que l'on aspire à travers, jusqu'à ce que l'eau ne soit plus acide. On conserve sous l'eau jusqu'au moment de l'utilisation.

e) On plonge dans la solution de protéine à concentrer et on applique le vide. L'opération se fait à 4°C. En fin de manipulation, on gratte, légèrement, pour ne pas arracher la membrane, la surface des bougies avec

une brosse ronde et souple pour détacher les protides collés à la surface.

On peut aussi rincer avec le même tampon que celui contenant les protéines et joindre le liquide de rinçage aux protéines concentrées.

f) Le nettoyage des bougies se fait par contact avec de la lessive de soude diluée, qui dissout le Parlodion.

L'application de ce procédé à l'hémolysine donne toujours d'excellents résultats.

On a cependant vérifié chaque fois que l'on n'obtenait aucun précipité en mélangeant du liquide filtré à une solution d'acide trichloracétique pour éliminer toute bougie ayant une éventuelle déchirure de sa membrane.

A la fin de la concentration, après grattage et rinçage du filtre, le rendement a toujours été voisin de 100 %.

F / SEPARATION DES PROTEINES PAR CHROMATOGRAPHIE

Nous examinerons successivement dans ce chapitre, la chromatographie d'adsorption sur phosphate de calcium, la chromatographie par échange d'ions sur échangeur cationique ou anionique à base de cellulose, et enfin la filtration sur gel de Sèphadex G 200.

I - CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE

TISELIUS (50) a étudié systématiquement la chromatographie des protéines sur colonne de phosphate de calcium. Au début, il utilisa le phosphate de calcium mélangé à de l'Hyflo-supercel, puis ensuite la brushite (51) qui est une forme plus stable de ce phosphate.

Les protéines sont adsorbées en solution phosphate de faible concentration et sont éluées en augmentant progressivement la force ionique du tampon.

Les résultats les plus intéressants étant obtenus avec les protides de poids moléculaires élevés, ce procédé devrait convenir pour le traitement de l'hémolysine.

Cette méthode présente l'avantage d'éluer les protéines, même de poids moléculaire élevé, sans faire de trainées. Les protéines adsorbées dans ces conditions, semblent subir, sous l'influence de l'éluant (tampons phosphate de concentrations croissantes), des variations brutales des valeurs de leur Rf, ces valeurs passant de zéro à un, quand la concentration en éluant atteint le point critique. C'est ainsi que de très faibles variations de la concentration du tampon sont déterminantes pour l'élution d'une protéine adsorbée.

TISELIUS pense que le mécanisme de ce type de chromatographie est différent des autres procédés de chromatographie d'adsorption et d'échange d'ions. L'affinité des protéines pour les ions Ca^{2+} de la colonne semble être déterminante pour leur comportement au cours de la chromatographie en phosphate de calcium.

1) Préparation de l'Hydroxylapatite (52) ($Ca_5 (PO_4)_3 OH$)

C'est l'une des formes les plus stables du phosphate de calcium, et moins sensible aux variations de pH que la brushite.

Dans la technique suivante, on prépare la brushite que l'on transforme ensuite en hydroxylapatite.

On fait couler, sous agitation, simultanément et à la même vitesse (environ 120 gouttes par minutes) deux litres de chacune des solutions aqueuses 0,5 M de $CaCl_2$ et de $Na_2 H PO_4$ contenues dans deux ampoules à décanter.

On décante le surnageant et on lave le précipité quatre fois, par décantation, chaque fois avec environ 4 litres d'eau distillée.

On ajoute de l'eau jusqu'au volume total de 4 litres, puis 100 ml d'une solution extemporanée de Na OH à 40 %.

On fait bouillir le mélange en agitant pendant une heure.

On décante après sédimentation du précipité et on lave de nouveau quatre fois, par décantation, avec de l'eau.

On ajoute le tampon phosphate à pH 6,8 et 0,1 M que l'on chauffe jusqu'à commencement d'ébullition (en évitant de faire bouillir). Après décantation, on ajoute le même tampon phosphate et, cette fois-ci, on fait bouillir pendant 5 minutes.

On décante et on fait bouillir une autre fois avec ce même tampon, pendant 15 minutes, puis deux fois 15 minutes chaque fois, avec le tampon 0,001 M de la même composition.

L'hydroxylapatite ainsi obtenue est conservée dans le tampon phosphate 0,001 M pH 6,8.

2) La colonne.

Elle est constituée par un tube de verre rétréci à sa partie inférieure, fermé à sa partie supérieure par un bouchon et portant un ajutage latéral

raccordé par un tube de caoutchouc à une ampoule à décanter contenant le tampon d'élution.

On bouche le bas de la colonne par de la mousse de fibres de téflon pour supporter l'adsorbant. Cet adsorbant est versé en suspension dans le tampon phosphate.

On laisse sédimenter puis écouler le tampon et recommence jusqu'à ce que la hauteur désirée soit obtenue.

Nous avons ainsi préparé une colonne de 15 cm de haut sur 2,5 cm de diamètre.

3) Chromatographie.

La chromatographie a été effectuée sur une hémolysine déjà partiellement purifiée par gradient de centrifugation.

Après vidange du tampon couvrant le phosphate de calcium, on dépose sur ce dernier 1 ml du produit à faible teneur en protides et de titre 36.500 U.H. 50 %.

La solution pénètre dans la colonne, puis on rince avec une petite quantité de tampon 0,001 M.

On élue par les tampons phosphate Sorensen (53) suivants :

a) Tampon phosphate pH 6,8 de force ionique 0,05 M
b) " " " " " 0,075 M
c) " " " " " 0,10 M
d) " " " " " 0,125 M
e) " " " " " 0,15 M

L'éluat a été reçu dans un collecteur de fraction à contact électrique réglé pour débiter des volumes de 5 ml, l'ensemble étant placé dans une chambre froide à + 4°C.

Le débit a été très faible : l'expérience a dû être poursuivie plusieurs jours.

4) Résultats :

Sur chaque fraction, on a effectué les déterminations suivantes :

a) Détection des protides : par détermination de la densité optique à 280 mμ contre le tampon d'élution correspondant à la fraction.

b) Recherche des fractions hémolytiques sur 0,05 ml selon la technique déjà décrite.

Les résultats obtenus permettent de tracer les courbes (Fig. 3).

Le pic donné par le premier tampon 0,05 M correspond à un produit non hémolytique : les tampons 0,075 M, 0,10 M et 0,125 M éluent des fractions hémolytiques que nous appelerons respectivement : Fraction I, II et III.

Le tampon 0,15 M ne donne plus aucune élution.

- la fraction I comprend les tubes de 48 à 54, soit 28 ml.
- " II " " " 69 à 88, soit 73 ml
- " III " " " 97 à 110 " 50 ml.

Dosage d'hémolysine renfermée dans ces fractions :

- fraction I 34,6 U.H. 50 % par ml, soit 970 U.H. 50 % pour 28 ml
- fraction II 120 U.H. 50 % par ml soit 8750 U.H. 50 % pour 73 ml
- fraction III 74 U.H. 50 % par ml soit 3700 U.H. 50 % pour 50 ml

Soit, si l'on additionne I + II + III = 13.420 U.H. 50 %, ce qui nous donne pour la chromatographie un rendement de 37 % et, pour la fraction principale (II) un rendement de 24 %.

Devant ce faible rendement, nous avons pensé à une rétention de l'hémolysine sur la colonne. Aussi, à du tampon phosphate pH 6,8 O,2 M, nous avons ajouté du NaCl 0,25 M pour éluer en bloc ces protides. Le résultat a été négatif.

Donc le rendement de cette chromatographie est assez faible.

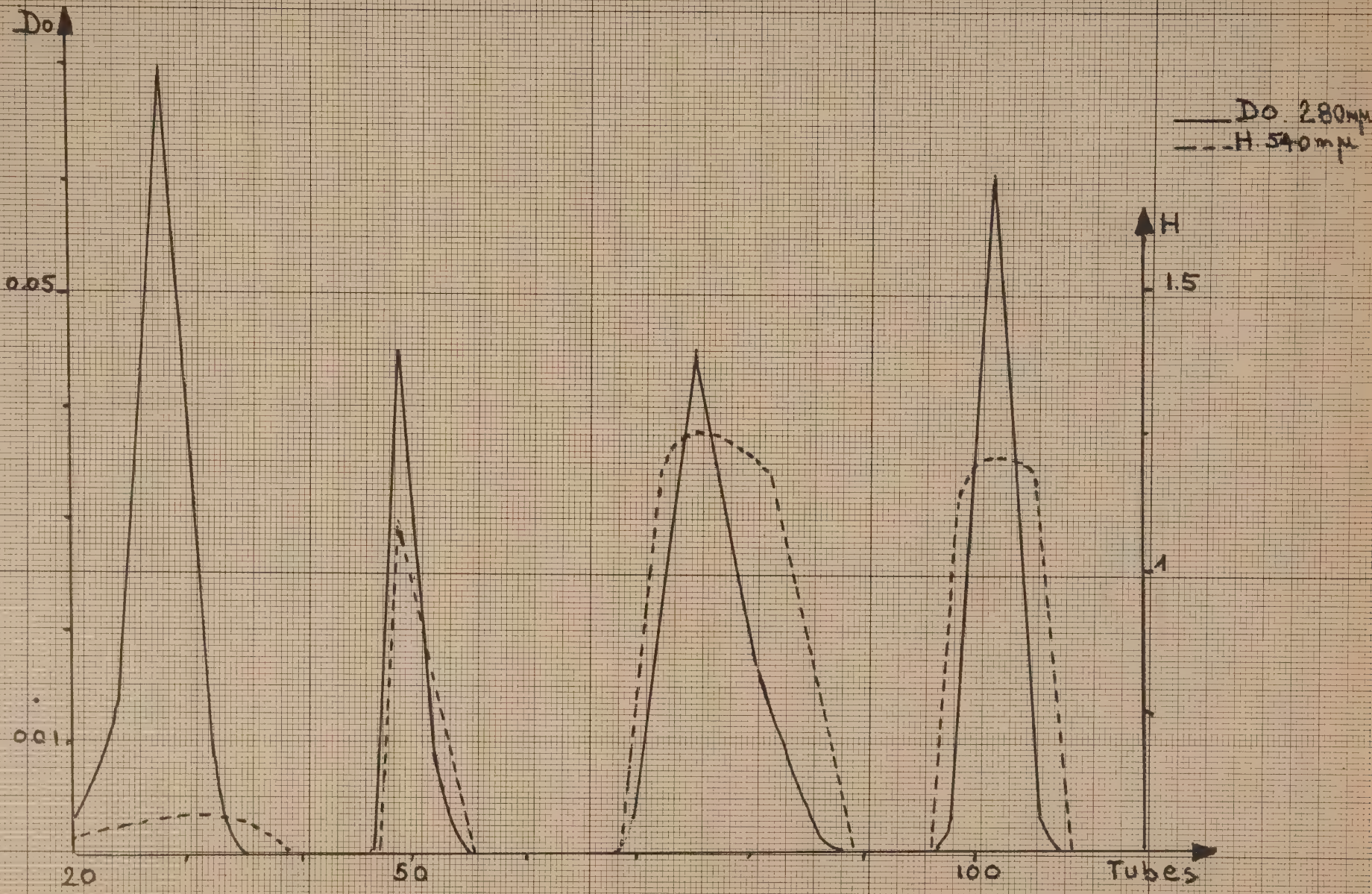


Fig 3

Etude de la purification : (à titre indicatif, car très faible teneur en protides).

- densité optique à 280 mμ = 0,018

$0,018 \times 0,1248 = 0,00225$ mg N par ml

$\frac{120}{0,00225} \neq 53.000$ U.H. 50 % par mg N

La purification obtenue par la chromatographie, le produit de départ étant à 25.000 U.H. 50 % par mg N, est : $\frac{53.000}{25.000} \neq 2$

Purification totale par rapport au sérum de départ titrant 2.000 U.H. 50 % par mg N : $\frac{53.000}{2.000} = 26,5$

ce qui est le meilleur résultat que nous ayons obtenu dans les chromatographies d'hémolysine.

Cependant, nous n'avons pas retenu la chromatographie sur hydroxylapatite pour purifier l'hémolysine pour les raisons suivantes :

a) La préparation du produit est très longue et la quantité préparée à chaque fois est assez faible.

b) Le débit est très faible : sur notre colonne, de 12 ml à l'heure au début, pour n'être à la fin, que de 5 à 6 ml pour une hauteur de filtration de 15 cm seulement.

c) La quantité de produit traité est trop faible pour obtenir suffisamment de produit pour effectuer une analyse chimique de la fraction séparée.

d) Le rendement en hémolysine de 24 % pour la fraction principale est trop faible.

Cependant, ce mode de chromatographie est un excellent moyen de séparation à retenir lorsque l'on ne recherche qu'une faible quantité de produit à un haut degré de pureté.

II - CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS D'IONS A BASE DE CELLULOSE.

Les premières chromatographies sur échangeurs d'ions furent réalisées sur des résines synthétiques.

SOBER (54), le premier, rechercha d'autres échangeurs d'ions présentant une surface active plus développée que celle des granules résineuses.

L'introduction dans la cellulose de groupes ionisables actifs, a permis à cet auteur de réaliser une série d'échangeurs particulièrement appropriés pour la chromatographie des macromolécules, ce qui nous a incité à l'utiliser pour l'hémolysine.

Pour éviter d 'obtenir des produits solubles ou gélatineux, PETERSON (55) a limité volontairement le nombre de groupes ionisables à 1 milli équivalent par g d'adsorbant.

Cette limitation du nombre de groupes incorporés ne semble pas avoir une répercussion sérieuse sur la capacité d'adsorption des protéines et présente, par contre, certains avantages pour leur désorption.

1) Cellulose échangeur de cations.

SOBER préconisa d'introduire dans la cellulose soit le groupement carboxyl qui donna le carboxy-méthyl-cellulose, soit le groupement phosphate.

a) La carboxy-méthyl-cellulose.

Nous avons seulement utilisé celle de fabrication Serva que nous avons purifiée, avant usage, de la façon suivante :

La C.M. cellulose est tout d'abord lavée avec une solution 0, 5 M de NaCl, puis par une solution 0, 5 N de NaOH.

Ensuite, on lave avec de l'acide acétique à 10 % par fractions successives, d'abord pour amener à la neutralité, puis ensuite à pH 5, 0 (virage du rouge Congo).

On lave enfin à l'eau distillée jusqu'à disparition totale de l'acidité dans cette eau.

On filtre sur Büchner et on peut, soit la conserver ainsi, en galette humide au froid pour un usage rapproché, ou bien la déshydrater par lavage à l'éthanol suivi d'évaporation sous vide, pour l'obtenir pulvérulente.

b) Chromatographie -

On prépare une colonne dans du tampon acétate 0,02 M. et pH 4,6.

Comme dans la chromatographie précédente sur hydroxylapatite, on a chromatographié un produit déjà partiellement purifié par un autre procédé.

On a déposé 5 ml de cette hémolysine de densité optique 3,80 à 280 mμ et titrant 12.250.U.H. 50 %.

Le collecteur est réglé pour donner des fractions de 5 ml.

Les tampons d'élution sont les suivants :

- tampon acétate 0,02 M pH 4,6
- " " " 0,05 M pH 5,2
- " "phosphate 0,08 M pH 6,0
- " " " " 0,10 M pH 7,0
- " " " " 0,10 M pH 9,0 plus NaCl 0,5 M

Sur chaque fraction, on détermine la dansité optique à 280 mμ ce qui permet de tracer la courbe d'élution protidique. (Fig. 4).

c) Résultats -

Les fractions intéressantes sont éluées par les tampons acétate 0,05 M pH 5,2 et phosphate 0,08 M pH 6,0.

On les a rassemblées ainsi que la fraction suivante et on obtient :

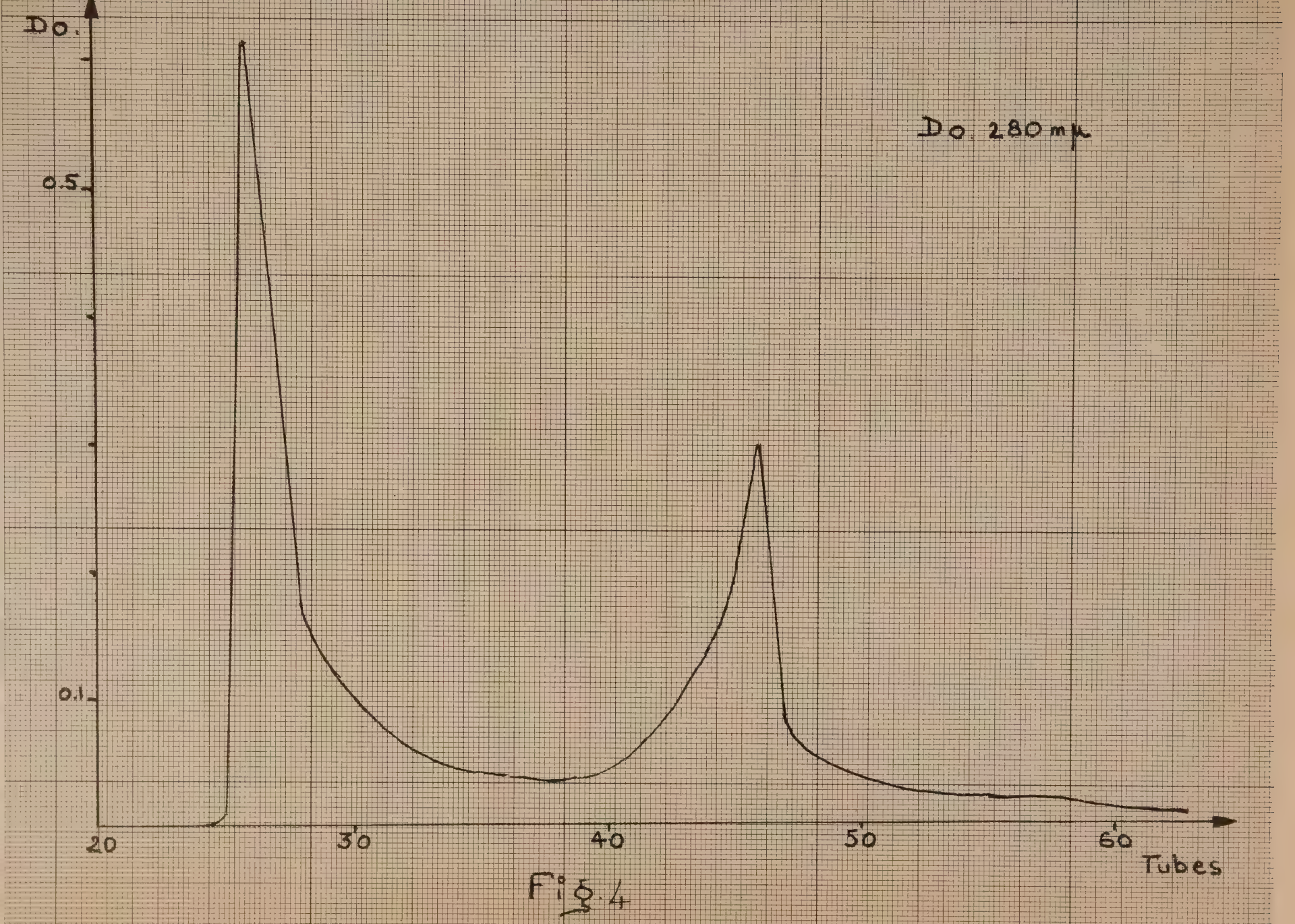


Fig. 4

- Fraction I Tube 25 à 34, soit 46 ml à 60 U.H. 50 % par ml
- Fraction II Tube 42 à 48, soit 31 ml à 75 " " " "
- Fraction III Tube 62 à 65, soit 17,5 ml à 10 " " " "

Ce qui correspond à :

- Fraction 1 : 2.760 U.H. 50 %
- Fraction II : 2.325 U.H. 50 %
- Fraction III : 175 U.H. 50 %

L'hémolysine macromoléculaire est éluée par les premiers tampons. En effet, on sait que sur C.M cellulose, les albumines et macroglobulines sont éluées en tête, puis ensuite les α 1, α2, β et γ globulines, l'ordre d'élution correspondant à la variation du point isoélectrique des protéines.

On récupère dans la fraction I : 22,5 % de l'hémolysine mise en oeuvre, 19 % dans le fraction II et 1,4 % dans le fraction III. Soit au total 43 %, ce qui est encore faible et nous a conduit à ébandonner la chromatographie sur C.M Cellulose pour la purufication de l'hémolysine.

2) Cellulose échangeur d'anions

La diethyl-aminoéthyl cellulose, préparée par PETERSON (55) a été utilisée en chromatographie comme échangeur d'anions.

Dans nos travaux, nous avons employé la D.E.A.E. cellulose de fabrication Eastman Kodak, que nous avons purifiée de la façon suivante :

On traite par la soude normale. On décante et on recommence jusqu'à ce que le surnageant soit propre. On filtre sur Büchner et on reprend dans une solution de HCl normale. On refiltre immédiatement. On relave à la soude, puis, plusieurs fois à l'eau jusqu'à disparition de l'alcalinité.

Comme pour la C.M cellulose, on garde humide ou on déshydrate à l'éthanol absolu.

L'élution des protides dans les chromatographies d'hémolysine sur D.E.A.E. cellulose a été effectuée de deux façons différentes : soit comme ont procédé Koyama (39) et Amiraian (36), par gradients, soit comme Stelos (12) par des tampons successifs.

Nous étudierons successivement ces deux modes d'élution :

- Elution par gradient

Toutes ces techniques dérivent de celle de SOBER(56) qui effectue une élution des protéines de points isoélectriques croissants à l'aide d'un gradient soit de sel de force ionique croissante, soit de pH décroissant, ou, éventuellement, les deux moyens combinés.

a) Appareillage :

Les deux solutions mères du gradient sont contenues dans un appareillage comparable à celui de Henry (57).

Etant donné que nous voulons obtenir un gradient linéaire, les flacons stockeur et mélangeur ont la même section horizontale. Ils communiquent à leur partie inférieure par une tubulure de faible diamètre, pour éviter la diffusion, et que l'on peut obturer.

Le liquide est agité dans le flacon mélangeur par un barreau magnétique.

Tout en recherchant une agitation rapide pour obtenir un mélange immédiat, la vitesse doit être cependant limitée pour éviter la formation d'un cône de cavitation qui, en élevant le liquide le long de la paroi, provoquerait une différence de niveau entre les deux récipients.

On emplit le flacon stockeur avec la solution la plus concentrée et le flacon mélangeur avec la plus diluée.

On règle soigneusement à la même hauteur.

Après avoir lancé l'agitation, on ouvre la communication entre les deux vases et on fait écouler le gradient linéaire ainsi formé.

b) La colonne :

La colonne utilisée est de 45 cm de hauteur sur 1, 5 cm de diamètre.

La D.E.A.E.cellulose a été équilibrée avec une solution de tris-hydroxyméthyl amino méthane 0, 001 M ramenée à pH 8, 6 par l'acide acétique.

Avant de préparer la colonne, on dégaze sous vide la suspension de cellulose dans le tampon jusqu'à fin d'élimination des bulles. On évite ainsi la formation de poches de gaz dans la masse de cellulose au cours de la chromatographie.

On prépare la colonne comme précédemment et on la lave par plusieurs litres de tampon de préparation.

c) Chromatographie :

On dépose sur la colonne 9 ml de sérum de titre 13.200 U.H. 50 % préalablement dialysé contre le tampon de départ.

On laisse adsorber, puis on lave par 20 ml de tampon.

Le gradient est composé de :

- 500 ml de solution tris-acétique pH 8, 6 0, 001 M
- 500 ml " " " " " " " 0, 2 M

En fin de gradient, on évite la traînée en accélérant l'élution par une solution 0, 25 M de phosphate mono-potassique, qui élève la molarité et surtout abaisse d'une façon importante le pH.

Le collecteur de fractions a été réglé pour obtenir des volumes de 5 ml.

L'expérience est réalisée en chambre à + 4°C.

d) Résultats :

Comme dans les chromatographies précédentes, on trace la courbe de concentration protéique et d'hémolyse. (Fig. 5)

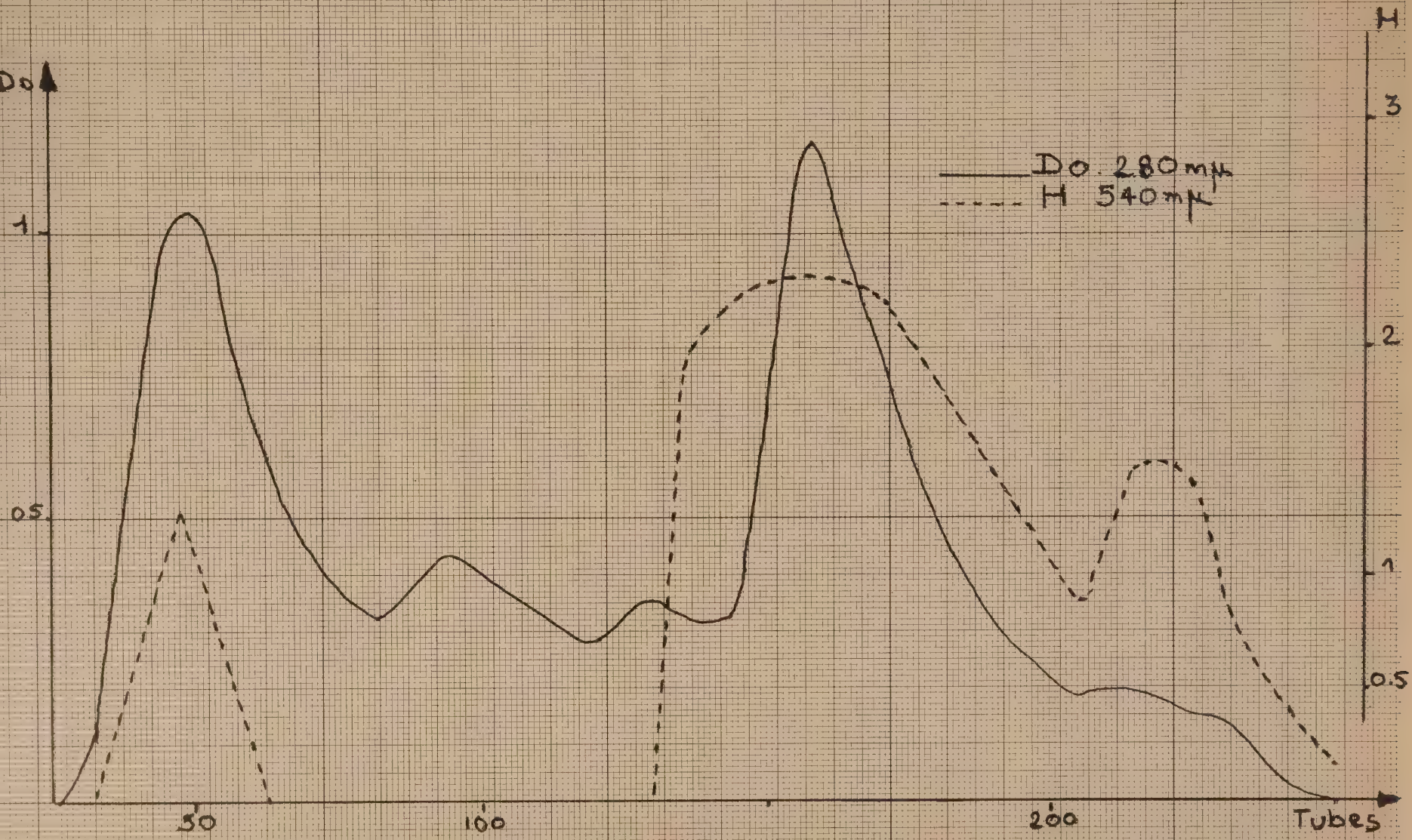


Fig. 5

On obtient la succession des pics suivants :

Tout d'abord un pic important correspondant aux γglobulines, puis un plus faible de βglobulines, suivi d'un autre encore plus faible d' α globulines et enfin un pic à nouveau très important des albumines et macroglobulines.

Ce résultat est comparable à celui de SOBER (58), qui caractérisa chaque fraction par électrophorèse et, pour éluer, avait utilisé le système suivant :

- tampon phosphate 0,005 M pH 7,0
- gradient jusqu'au tampon 0,02 M pH 6,0
- " " " " $NaH_2 PO_4$ 0,05 M
- " " " " NaCl 0,02 M $NaH_2 PO_4$ 0,05 M
- " " " " NaCl 0,05 M $NaH_2 PO_4$ 0,05 M
- " " " " NaCl 0,1 M $NaH_2 PO_4$ 0,05 M

Le gradient de tris acétique ne fait apparaître que les protides principaux et sa courbe d'élution protéique, sauf en ce qui concerne les macroglobulines, est similaire à celle obtenue par lecture au densitomètre de l'électrophorèse sur papier ; d'où son réel intérêt.

Du point de vue hémolysine on obtient deux pics :

- un premier assez petit à sommet correspondant à celui d'élution des γglobulines : c'est donc l'hémolysine 7 S.
- un second beaucoup plus important débutant à la fin des α globulines et couvrant tout le pic albumine. Il est dû aux macroglobulines éluées en même temps. C'est donc un pic d'hémolysine 19 S, ce qui explique qu'il soit plus important que le 7 S élué au début.

Pour étudier le rendement, on rassemble certains tubes en trois fractions.

- Fraction I du tube 40 à 60 soit 92 ml
- Fraction II du tube 135 à 205 soit 325 ml
- Fraction III du tube 206 à 246 soit 182 ml

La fraction I est l'hémolysine 7 S

La fraction II est l'hémolysine 19 S éluée par le gradient

La fraction III est l'hémolysine 19 S éluée par le phosphate.

Ayant déposé sur la colonne 9 ml à 13.200 U.H. 50 %, on a introduit au total 118.800 U.H. 50 %.

Le dosage des fractions donne les résultats suivants :

- Fraction I 10 U.H. 50 % par ml, soit 920 U.H. 50 %
- Fraction II 320 U.H. 50 % par ml soit 104.000 " "
- Fraction III 23 U.H. 50 % par ml soit 4.200 " "

Soit les rendements respectifs de 0,8 % pour la fraction I, 87,5 % pour la fraction II et 3,5 % pour la fraction III.

D'où un rendement total de 91,8 %, ce qui est remarquable.

Le degré de purification de l'hémolysine, obtenue par ce type de chromatographie est nettement insuffisant, l'albumine se trouvant jointe à la fraction hémolytique principale.

La purification serait améliorée en utilisant une globuline 50 %, comme nous l'avons fait au cours de l'étude de la durée d'immunisation.

Cependant, même dans ce cas, l'élution par un gradient au tris ne permet pas d'obtenir une purification suffisante, comme on peut en effet l'observer sur la courbe, où les pics sont rapprochés et les minima ne redescendent pas assez bas ; le lavage de la colonne est insuffisant entre l'élution de chaque fraction, d'où contaminations néfastes à la purification.

- Elution par tampons successifs :

Dans ce cas, on a combiné la diminution de pH et l'augmentation de molarité des tampons éluants.

Nous avons utilisé la technique de LOSPALLUTO (59), étudiée pour séparer les anticorps 19 S du sérum humain.

a) La colonne :

Une colonne de 40 cm de hauteur sur 4 cm de diamètre a été utilisée.

Il y a lieu de signaler à ce sujet que nous avons observé que les meilleurs résultats de chromatographie étaient obtenus avec emploi de colonnes dont le diamètre était le 1/10ème de la hauteur ; ce rapport optimum de 10 étant valable tant pour le travail sur cellulose que sur gel expérimenté par la suite.

La D.E.A.E. cellulose a été équilibrée en tampon phosphate pH 8,8 de force ionique 0,01 M (phosphate disodique ajusté à ce pH par NaOH), qui a servi à la préparation puis au lavage de la colonne.

b) Chromatographie :

On a déposé 25 ml de globuline 50 % exempte d'euglobuline et préalablement dialysée contre le tampon de préparation de la colonne, de titre 20.500 U.H. 50 % par ml, soit 512.000 U.H. 50 %.

L'élution a été effectuée par les tampons suivants :

1 - Tampon phosphate pH 7,0 de force ionique 0,01 M

2 - " " " pH 7,0 " " 0,025 M

3 - " " " pH 6,0 " " 0,1 M

4 - " " " pH 5,0 " " 0,15 M plus NaCl 0,15 M

Ce dernier tampon est constitué par une solution de phosphate monopotassique ramené à pH 5,0 par de la potasse, dans laquelle on ajoute le NaCl. On travaille en chambre à + 4°C et on reçoit sur un collecteur en fractions de 10 ml.

Ce système permet un lavage complet de la colonne avant de passer un nouveau tampon.

c) Résultats :

On détermine sur chaque fraction les teneurs en protides à 280 mμ

et en hémolysine ; ce qui permet de tracer la courbe (Fig 6).

On obtient trois pics protidiques principaux.

Le tampon pH 7,0 de force ionique 0,025 M ne donnant qu'une fraction très peu importante que nous négligerons.

Le tampon 1 élue les γglobulines, c'est-à-dire les protides 7 S, l'hémolysine 7 S y est donc contenue.

Le tampon 3 élue globalement les α et β globulines et des traces de γglobulines restantes, ce qui explique que ce pic soit aussi légèrement hémolytique.

Le tampon 4 élue, quant à lui, les macroglobulines 19 S, donc l'hémolysine recherchée.

Les fractions hémolytiques ont été rassemblées comme suit :

- Fraction 1 du tube 36 à 56 soit 200 ml
- Fraction II du tube 234 à 252 soit 170 ml
- Fraction III du tube 368 à 386 soit 180 ml
- Fraction III bis du tube 387 à 420 soit 320 ml.

La détermination des titres hémolytiques de ces différentes fractions conduit aux résultats suivants :

- Fraction I 30 U.H. 50 % par ml, soit 6.000 U.H. 50 %
- Fraction II 28 " " " " " 4.800 " "
- Fraction III 2.050 " " " " " 369.000 " "
- Fraction IIIbis 40 " " " " " 12.800 " "

Soit pour toute la chromatographie 392.600 U.H. 50 %.

Le rendement total est donc de 77 % et celui de la fraction III hémolitique 19 S de 72 %, ce qui est donc excellent.

La purification n'a été étudiée que pour la fraction III, seule importante pour l'hémolysine.

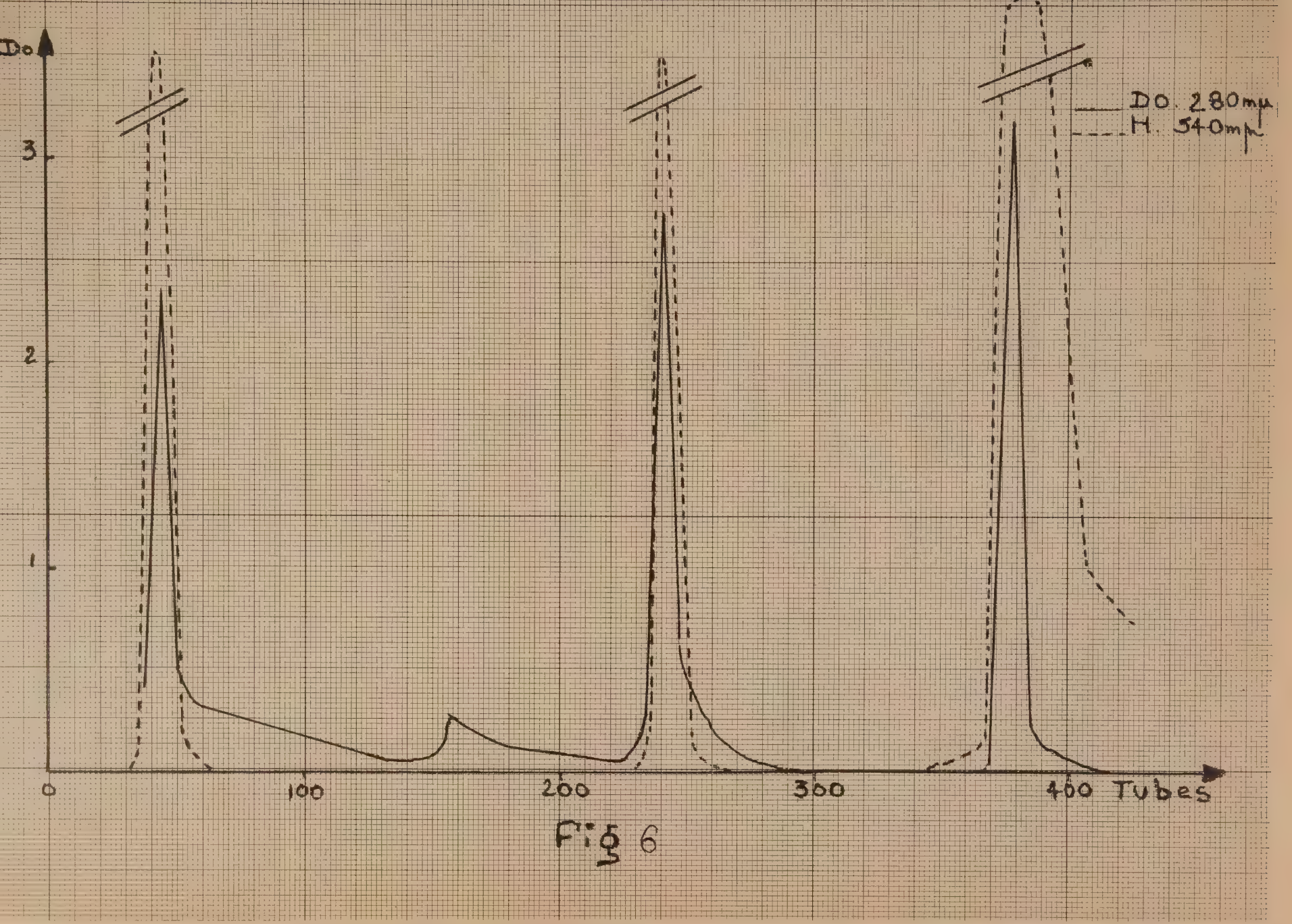


Fig 6

La densité optique à 280 mμ est de 0,950

soit : 0,95 x 0,1248 = 0,118 mg N par ml

$$\frac{\text{titre}}{\text{mg N par ml}} = \frac{2.050}{0,118} = 17.400 \text{ U.H. 50 \% par mg N}$$

Le sérum de départ étant à 2.000 U.H. 50 % par mg N, le coefficient de purification est de :

$$\frac{17.400}{2.000} = 8,7$$

ce qui est aussi un bon résultat.

Le rendement en hémolysine et le coefficient de purification étant convenables, nous avons utilisé ce procédé de chromatographie sur D.E.A.E. cellulose dans la suite de ce travail.

III - FILTRATION SUR GEL

La filtration s'effectue dans ce cas sur "tamis moléculaire" qui, à l'image d'un tamis, arrête par adsorption des molécules inférieures à une certaine dimension et laisse passer les autres.

Les zéolithes cristallines naturelles ou artificielles, douées de telles propriétés, sont utilisées pour le fractionnement des molécules de très petites dimensions.

1) Le Sephadex G 200

Dans notre étude, nous avons utilisé le gel de Sephadex de Pharmacia Uppsala. Le produit est élaboré à partir de dextrane, polysaccharide obtenu par biosynthèse à partir du sucre par le leuconostoc mésentéroïdes.

Le dextrane est hydrolysé pour avoir un produit de masse moléculaire déterminée. On le réticule ensuite par action de l'épichlorhydrine.

On doit, selon FLODIN (61) utiliser la qualité de Sephadex G 200 pour séparer les protéines du sérum, qui, ainsi que le montrent les résultats d'ultra-centrifugation, libère des protides à coefficients de sédimentation

décroissants. Il s'en suit que l'augmentation de rétention de la colonne va de pair avec la baisse du poids moléculaire du protide.

KILLANDER (62) détermina que les protides correspondant respectivement aux premier, second et troisièmes pics, étaient essentiellement des 19 S pour le premier, 7 S et 5 S pour le deuxième et uniquement du 4 S pour le troisième.

Donc le Sephadex G 200 est un matériau de filtration de choix pour réaliser la séparation des protides 19 S telle l'hémolysine.

AMIRAIAN (63), le mettant également en oeuvre, a signalé que l'hémolysine est renfermée dans les fractions d'élution correspondant au premier pic, ce qui est en accord avec les résultats de FLODIN.

2) Colonne

Nous avons utilisé le tampon de Mayer tant pour préparer, qu'éluer la colonne, ce qui permet de faire directement la sérologie dans de bonnes conditions.

On fait gonfler le Sephadex G 200 dans ce tampon et on laisse partiellement décanter ; on élimine alors le surnageant contenant les fines particules de façon à obtenir un gel à pouvoir filtrant plus rapide.

La colonne utilisée a 65 cm de hauteur sur 4 cm de diamètre.

Dans l'utilisation du Sephadex, la préparation de la colonne doit se faire à + 4°C pour éviter la formation de bulles de gaz que l'on peut observer, même après dégazage, lorsque la préparation est effectuée à température ambiante, puis ramenée à + 4°C.

Si l'on obture la colonne de la même façon que celle de cellulose par de la mousse de fibres de téflon, il se produit un colmatage rapide, qui peut être évité soit en recouvrant la mousse de fibres de téflon par une couche de 1 cm de très petites billes de verre, soit en maintenant le Sephadex entre deux rondelles de "Vyon", plastique poreux de "Porous Plastics Limited".

On lave la colonne ainsi préparée au tampon de Mayer.

3) Chromatographie

On dépose sur la colonne 10 ml de sérum préalablement dialysé contre le tampon de Mayer et titrant 17.600 U.H. 50 % par ml, soit au total 176.000 U.H. 50 %.

On laisse adsorber puis on lave et élue par le tampon de Mayer.

On reçoit sur un collecteur de fractions réglé à 5 ml. Le débit de filtration est de 7 tubes à l'heure, soit au total 35 ml à l'heure.

4) Résultats

On trace la courbe de teneur en protide et celle d'activité hémolytique : (Fig. 7).

La courbe des protides présente trois pics successifs qui, comme nous l'avons vu précédemment, correspondent respectivement aux macroglobulines, globulines puis albumines.

Après un retour au zéro de la densité optique, on observe toujours sur Sephadex G 200 un petit pic qui semble correspondre soit aux petits peptides, soit à des acides aminés élués en dernier, en raison de leur faible poids moléculaire.

Du point de vue hémolysine, on constate une élévation très importante dès le début du passage des protides. Cependant, cette élévation est suivie d'une chute verticale avec un minimum correspondant au maximum du premier pic protéique.

Ce phénomène semble anormal, car au maximum protéique de cette fraction 19 S, devrait correspondre au contraire un maximum hémolytique.

On note une coïncidence entre les sommets du deuxième pic protéique et d'un pic hémolytique plus faible, dû à l'hémolysine 7 S et à des traces d'hémolysine 19 S non complètement éluées dans les fractions précédentes.

Au troisième pic protéique d'albumines correspond un léger pic

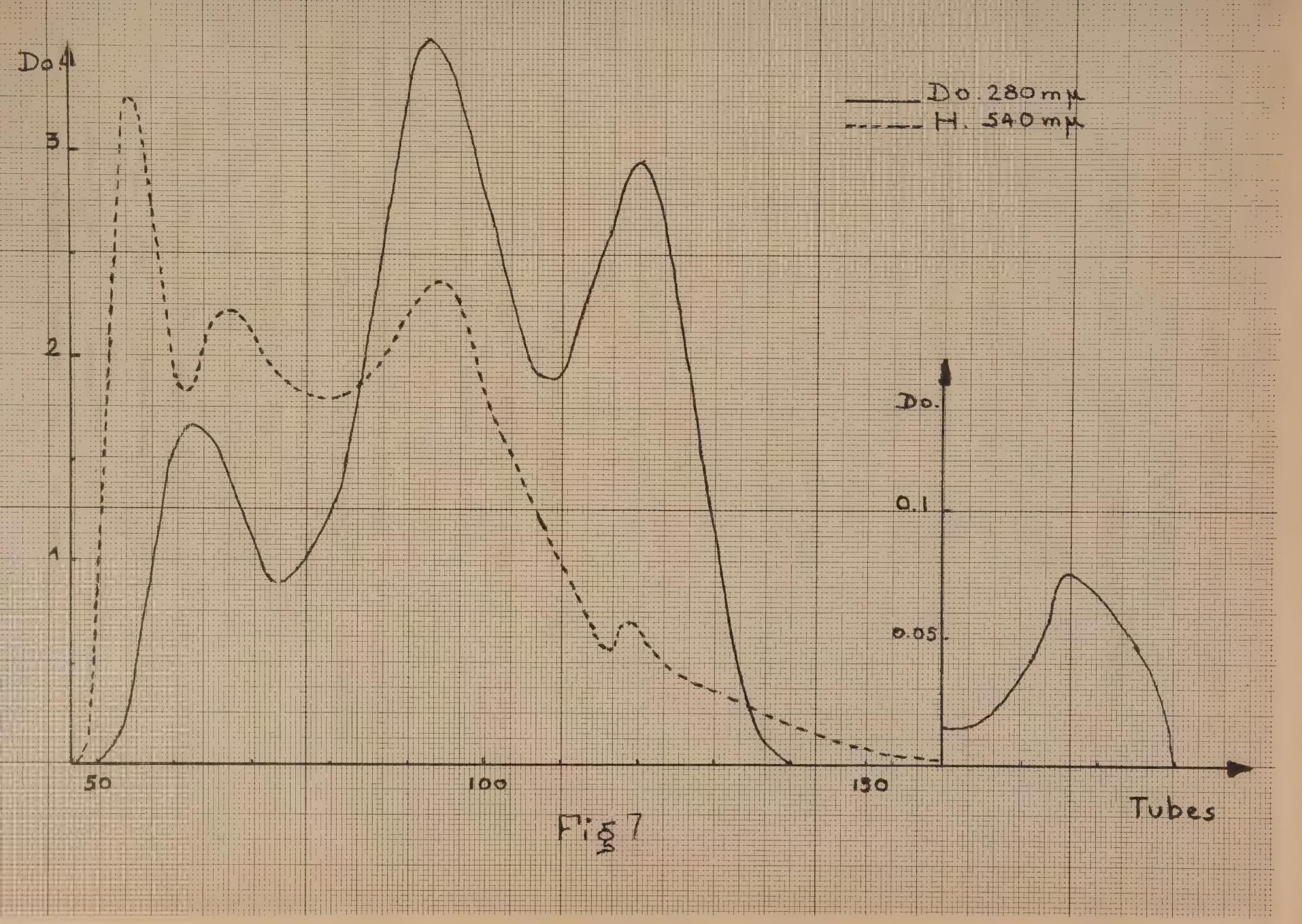


Fig 7

hémolytique dû à l'hémolysine 7 S ayant trainé sur la colonne.

Le quatrième pic cité n'est pas hémolytique.

Se référant à ces observations, on prépare trois fractions :

- Fraction I tube 48 à 80 soit 140 ml
- Fraction II tube 81 à 116 soit 148 ml
- Fraction III tube 117 à 150 soit 155 ml

Leurs titres hémolytiques sont :

- Fraction I 576 U.H. 50 % par ml soit 80.640 U.H. 50 %
- Fraction II 52 U.H. 50 % par ml soit 7.750 U.H. 50 %
- Fraction III 6 U.H. 50 % par ml soit 930 U.H. 50 %

Ce qui, par rapport aux 176.000 U.H. 50 % de départ, donne les rendements suivants :

- Fraction I 45,8 %
- Fraction II 4,4 %
- Fraction III 0,5 %

Soit, en définitive, un rendement total de 50,7 %.

Ce résultat nous semble anormal, le rendement par utilisation du Sephadex G 200 devant être beaucoup plus élevé.

Ceci peut s'expliquer par la remarque précédente sur la correspondance entre le minimum d'activité hémolytique et le premier maximum protéïque ; il est probable en effet, que le rendement en hémolysine soit supérieur au chiffre donné ci-dessus, et ce, du fait qu'un inhibiteur du complément s'éluerait dans les fractions correspondantes au sommet du pic 19 S et masquerait ainsi l'hémolysine également présente.

Malgré ce mauvais rendement apparent, nous utiliserons néanmoins le Sephadex G 200 pour la purification d'une globuline 50 %.

Comme on le verra, le rendement sera bien meilleur, ce qui apportera une confirmation de la présence de cet inhibiteur.

o0o

TROISIEME PARTIE

PREPARATION

DE L'HEMOLYSINE 19 S PURIFIEE.

Le fractionnement chromatographique sur D.E.A.E. cellulose, retenu dans la partie précédente, ne s'extrapolant pas à l'obtention de quantités importantes de produit, nous préparons le lot d'étude par filtration sur Sephadex G 200 et purifions l'hémolysine obtenue par ultracentrifugation sur deux gradients isopycniques successifs de saccharose.

Nous préparerons l'hémolysine 19 S à pureté élevée en effectuant tout d'abord la chromatographie d'une globuline 50 % de sérum hémolytique, puis en purifiant les fractions actives par gradient de centrifugation.

Dans le premier stade, nous avons essayé soit la chromatographie sur D.E.A.E. cellulose, soit la filtration sur Sephadex G 200.

A / OBTENTION DES FRACTIONS HEMOLYTIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE.

I - TRAITEMENT SUR D.E.A.E. CELLULOSE

On prépare une globuline 50 % à partir de 1.445 ml de sérum hémolytique préparé selon le procédé Darter (19) titrant 20.000 U.H. 50 % par ml, soit au total :

$$28,9 \times 10^6 \text{ U.H. 50 \%}$$

1) Globuline 50 %

On commence par diluer ce sérum dans l'eau physiologique et l'amener à un volume de 4 litres.

On y ajoute 4 litres de solution de sulfate d'ammonium à saturation sous agitation magnétique.

On protège des contaminations par addition de merthiolate à 1/10.000.

On sépare le précipité par centrifugation.

On lave au sulfate d'ammonium à demi-saturation.

On dialyse le précipité de globulines ainsi préparé, tout d'abord contre une solution de NaCl 0,5 M, puis contre le tampon phosphate 0,01 M pH 7,1.

Cette globuline obtenue avec un rendement en hémolysine de 100 % a été utilisée pour le traitement par chromatographie.

2) Chromatographie

On procède selon la technique de LOS PALLUTO (59).

La colonne de D.E.A.E. cellulose est préparée avec le tampon phosphate précédent.

La colonne utilisée a 80 cm de hauteur sur 8 cm de diamètre.

On y dépose 400 ml de la globuline précédente.

On lave successivement par :

- 4 litres de tampon phosphate pH 7,0 de force ionique 0,01 M
- 4 " " " " " pH 7,0 " " " 0,025 M
- 6 " " " " " pH 6,0 " " " 0,1 M

On revient ainsi à une densité optique nulle à 280 m .

Pour éviter l'obtention d'un produit trop dilué et la formation d'une trainée protéïque sur le colonne, nous avons procédé de la façon suivante :

La cellulose étant maintenue entre deux plaques de Vyon, on retourne la colonne. L'élution se fait alors rapidement avec de faibles volumes, ce qui permet d'accélérer la concentration ultérieure des protéïnes.

Sur la colonne ainsi retournée, on fait passer le tampon phosphate pH 5,0 de force ionique 0,15 M plus 0,15 M en NaCl.

On reçoit sur un collecteur en fractions de 10 ml.

On les divise en deux lots.

- Lot 1 composé des tubes de densité optique à 280 m supérieur à 1.
- Lot 2 formé des tubes de densité optique inférieure à 1.

3) Résultats

Le lot 1, d'un volume de 1.180 ml et de titre 6.000 U.H. 50 % par ml, renferme donc $7,08 \times 10^6$ U.H. 50 %, soit 24,5 % de l'hémolysine de départ.

Le Lot 2 quant à lui, de 3.000 ml et de titre 75 U.H. 50 % par ml, ne contient que 225.000 U.H. 50 %, soit 0,7 % de l'hémolysine initiale.

Le rendement global de 25,2 % est très faible, vraisemblablement par suite d'une extrapolation défectueuse de la chromatographie à des quantités trop importantes de protides, On a dû dépasser le taux de saturation en protéïnes de la colonne et ne pas retenir totalement ces dernières. Néanmoins, on aurait pu penser que les macroglobulines, protides les plus facilement adsorbables, car les derniers élués sur D.E.A.E. cellulose, auraient dû être retenues sur la colonne avec fixation totale des 19 S sur cette cellulose.

4) Purification

La densité optique du lot 1 est de 3,00

soit 3 x 0,1248 = 0,374 mg N par ml

$\frac{6.000}{0,374}$ = 16.000 U.H. 50 % par mg N

Le sérum initial étant de 2.000 U.H. 50 % par mg N, le coefficient de purification est de :

$$\frac{16.000}{2.000} = 8$$

En dépit de cette purification satisfaisante, nous avons dû, en égard aux difficultés d'adaptation au traitement de quantités importantes de produit, abandonner ce procédé chromatographique qui avait pourtant conduit à un rendement de 77 % avec purification analogue de 8,7 lorsqu'il était appliqué au traitement de volumes beaucoup plus réduits.

Pour cette raison, nous lui avons substitué la filtration sur Sephadex G 200.

L'hémolysine ainsi séparée est concentrée sur ultrafiltre au Parlodion, puis dialysée contre le tampon phosphate 0,01 M pH 7,0 pour ramener à la neutralité.

Il se forme alors un précipité dû à la baisse de molarité.

Le produit de départ étant à $7,1 \times 10^6$ U.H. 50 % et le surnageant du précipité d'un volume de 45 ml et de titre 47.000 U.H. 50 %, soit $2,1 \times 10^6$ U.H. 50 %, le précipité est donc de 5×10^6 U.H. 50 % soit 70 % du produit.

Ce précipité s'est révélé insoluble même en alcalinisant (pH 9) ou en augmentant la molarité.

La chromatographie sur D.E.A.E. cellulose, au cours de laquelle on est amené à faire varier molarité et pH, a donc l'inconvénient de conduire à un produit qui précipite de façon irréversible dès qu'on le purifie, même partiellement. Là encore, la filtration sur Sephadex ne présente pas ce défaut.

Tenant compte des observations précédentes, nous avons toujours, par la suite, équilibré l'hémolysine contre de l'eau physiologique, donc à la même molarité que le sérum, tamponné en phosphate 0,01 M à pH 7,0 ce qui réduit convenablement les pertes par précipitation.

II - TRAITEMENT SUR SEPHADEX G 200

Comme signalé précédemment, la D.E.A.E. cellulose, si elle se prêtait au traitement de faibles volumes, ne donnait pas de bons résultats dans l'application à des volumes plus importants et nous lui avons substitué le Sephadex G 200.

Nous avons observé également que ce dernier ne donnait pas de bons rendements sur sérum total, par suite de la présence d'un inhibiteur s'éluant en même temps que l'hémolysine 19 S. Nous avons donc utilisé une globuline 50 % au lieu du sérum total.

1) Essai préliminaire

Nous employons comme solution de préparation et d'élution de la colonne, l'eau physiologique tamponnée et ce, pour les raisons exposées précédemment.

a) Chromatographie :

Elle s'effectue sur colonne de 40 cm de hauteur sur 4 cm de diamètre, le Sephadex étant maintenu entre deux plaques de Vyon.

On dépose 4, 5 ml de globulines 50 % équilibrées en tampon de préparation de la colonne titrant 5.000 U.H. 50 % par ml, soit au total 22.500 U.H. 50 %.

On opère à + 4°C et on reçoit en fractions de 5 ml.

b) Résultats :

On trace les courbes d'élution des protides et des teneurs en hémolysine (Fig. 8).

Du point de vue des protéïnes : deux pics sont visibles, correspondant, le premier, petit, aux macroglobulines 19 S et le second, plus important, aux globulines 7 S.

Le troisième pic que l'on observait sur sérum total, a disparu avec l'élimination des albumines au cours de la préparation de la globuline 50 %.

En ce qui concerne l'hémolysine : on observe également deux pics : le premier, le plus important, correspondant à l'hémolysine 19 S et le second, plus petit, à l'hémolysine 7 S et à la trainée formée par les 19 S.

On constate la disparition du phénomène d'inhibition intéressant le premier pic dans la chromatographie du sérum total ; ce qui sera également vérifié lors du calcul du rendement.

On rassemble en fractions :

- Fraction I Tubes n° 34 à 46, soit 54 ml
- Fraction II Tubes n° 47 à 80, soit 150 ml

Les titres hémolytiques sont :

- Fraction I 320 U.H. 50 % par ml, soit 17.300 U.H. 50 %
- Fraction II 20 U.H. 50 % par ml, soit 3.000 U.H. 50 %

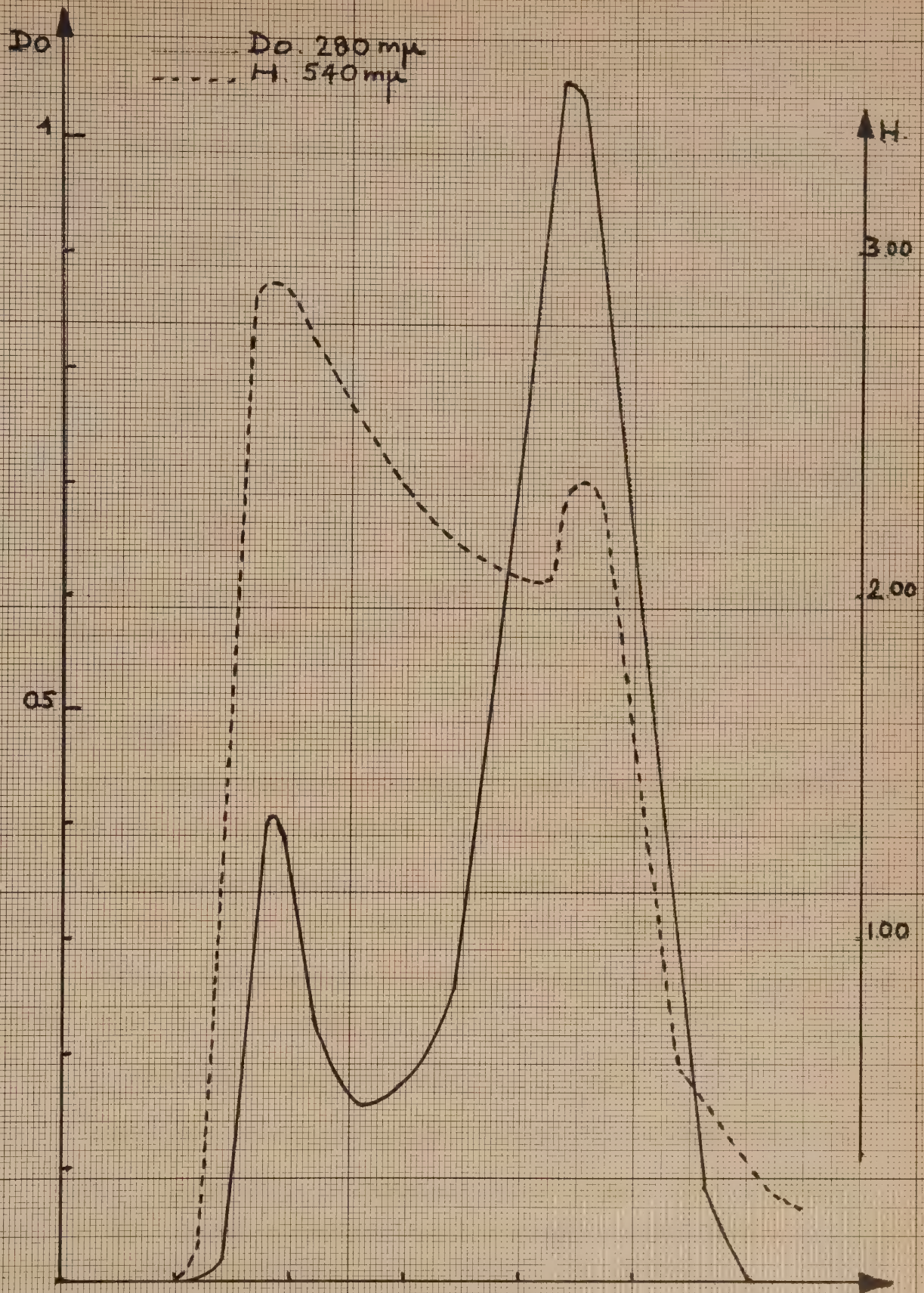


Fig 8

Soit, par rapport aux 22.500 U.H. 50 % de départ, 77 % pour la fraction I et 13 % pour la fraction II et au total, pour toute la chromatographie, 90 %.

Ce rendement est bien supérieur à celui obtenu sur sérum total et qui n'était que de 50 %.

c) Purification :

La densité optique de la fraction I à 280 mμ est de 0,240, soit :

$$0,24 \times 0,1248 = 0,03 \text{ mg N par ml}$$

$$\frac{320}{0,03} = 10.700 \text{ U.H. 50 \% par mg N}$$

Le sérum de départ étant à 2.000 U.H. 50 % par mg N, la purification est de : $\frac{10.700}{2.000} = 5,3$

Ayant obtenu un bon rendement et une purification acceptable, cette méthode a été appliquée au traitement d'un volume plus important de globuline 50 %.

2) Extension de la méthode

On a préparé une globuline 50 % du sérum hémolytique que l'on dialyse contre du tampon phosphate 0,01 M à pH 7,0 plus 0,15 M en NaCl.

La colonne de Sephadex G 200 de 80 cm de hauteur sur 8 cm de diamètre, maintenue sur Vyon, est préparée avec le même tampon.

On dépose sur la colonne 100 ml de la même globuline 50 % que celle utilisée sur D.E.A.E. cellulose.

On adsorbe puis élue à l'aide du même tampon.

Comme dans la chromatographie précédente, on obtient deux pics.

On ne conserve que les fractions correspondant au premier et on les concentre par ultra-filtration sur une bougie enduite d'un film de Parlodion, jusqu'à obtention d'un volume de 25 ml de protéine.

- Purification :

La densité optique de ce concentré à 280 mμ est de 92 et son titre hémolytique de 140.000 U.H. 50 % par ml,

Il renferme : 92 x 0,1248 = 11,48 mg N par ml

$$\frac{140.000}{11,48} = 12.200 \text{ U.H. 50 \% par mg N}$$

Le coefficient de purification est donc :

$$\frac{12.200}{2.000} = 6,1$$

Donc, l'extension de la méthode ne nuit pas à la purification, qui est passée de 5,3 en microméthode à 6,1 en macrométhode.

Ces 25 ml vont servir de base pour l'étape ultérieure de purification sur gradient de centrifugation.

B / PURIFICATION DES FRACTIONS HEMOLYTIQUES PAR CENTRIFUGATION SUR GRADIENT.

I - ESSAI PRELIMINAIRE

La séparation des macromolécules 19 S des 7 S devrait se faire aisément par centrifugation de l'hémolysine brute, toutefois, ainsi que nous l'avons vu précédemment, la centrifugation directe ne peut être appliquée, ces protides se sédimentant en bloc. Nous avons donc été amenés à essayer la centrifugation sur gradient.

1) Gradients de centrifugation (64)

En centrifugation classique, la substance recherchée est obligée de migrer à travers un milieu homogène liquide. Il se forme des courants de convexion que la présence d'un gradient élimine presque complètement. Il peut être préparé avec une substance de faible masse moléculaire diffusant rapidement, telle que saccharose, chlorure de césium, tartrate de potassium...

On peut former le gradient au cours de la centrifugation ou le préformer en déposant dans les tubes des solutions de densité décroissante.

En fonction de la qualité de la sédimentation obtenue, on peut classer les gradients en trois sortes :

- Gradient différentiel ou à taux zonal d'ANDERSON (65)

La substance à séparer est déposée sur le gradient préformé. On centrifuge dans un rotor à pots basculants, pendant un temps relativement court de 30 minutes à 3 heures, avec une accélération de 70.000 à 170.000 g.

Les particules se classent en zones plus ou moins épaisses, suivant leur taux de sédimentation respectif, d'où la désignation à "taux zonal".

La densité des particules est le facteur déterminant du classement zonal, toutefois leurs taille et forme et par ailleurs la viscosité du milieu

peuvent modifier les conditions de non-équilibre dans lesquelles elles se trouvent.

- Centrifugation de zone à l'équilibre de BRAKKE (66)

En prolongeant la durée de centrifugation jusqu'à 6 à 10 heures, la plupart des particules atteignent une position voisine de l'équilibre qui est fonction de leur densité. Elles se rassemblent en zones proches de la position d'équilibre. La séparation est améliorée par rapport à celle obtenue dans la technique précédente d'ANDERSON.

- Gradient isopycnique de MESELSON (67)

En augmentant encore la durée de centrifugation jusqu'à 24 heures et même plus, toutes les particules atteignent leur position d'équilibre et elles se rassemblent en des points où les densités du liquide et de la particule sont égales (position isopycnique), ce qui conduit à la séparation la meilleure que l'on puisse atteindre.

En égard à la grande durée de cette centrifugation, on peut soit utiliser un gradient préformé, soit le former par centrifugation.

Nous avons utilisé cette dernière sorte de gradient et centrifugé sur Spinco modèle L.

Préférant le rotor SW 25 au SW 39 par suite de la plus grande capacité du premier (34 ml par pot contre 5 ml, soit pour les trois pots 102 ml contre 15 ml). Nous avons utilisé un gradient préformé, car la vitesse de rotation du rotor SW 25 étant plus faible, son élaboration par centrifugation aurait été trop longue.

2) Préparation du gradient.

Nous avons utilisé des solutions de saccharose qui nous ont paru avoir une action moins dénaturante sur les protéïnes que celles de chlorure de césium, car elles peuvent, du fait de leur viscosité, être utilisées à plus faible molarité.

Ces solutions ont été préparées en tampon phosphate 0,01 M pH 7,0 pour maintenir l'hémolysine à pH constant et prévenir ainsi sa dénaturation.

Le gradient est obtenu au départ des deux solutions suivantes :

- Solution à 40 % de saccharose en phosphate 0,01 M pH 7,0
- Solution à 5 % de saccharose en phosphate 0,01 M pH 7,0

Pour sa formation, nous avons utilisé un appareil comparable à celui déjà décrit pour la préparation des gradients d'élution en chromatographie.

Il comporte deux compartiments : l'un stockeur, renfermant la solution la plus diluée, l'autre mélangeur, dans lequel se trouve la solution la plus concentrée. Ces deux compartiments communiquent par une tuyauterie de faible diamètre que l'on peut obturer par vis pointeau.

Le mélangeur est muni d'un ajutage pour permettre l'écoulement du gradient.

Par suite du faible volume des récipients (15 ml environ chaque) on ne peut utiliser un agiteur magnétique par suite du volume trop important du barreau et des vibrations engendrées.

On provoque le mélange avec un fil de platine en forme de U, entraîné par une turbine pneumatique, cet ensemble ne donnant aucune vibration.

On introduit 15 ml de solution de saccharose à 5 % dans le stockeur et 15 ml à 40 % dans le mélangeur.

On lance la turbine à allure moyenne pour éviter la cavitation, puis on ouvre la communication entre les deux compartiments.

Le gradient s'écoule contre la paroi interne d'un tube de cellulose à sa partie supérieure.

On obtient ainsi un gradient préformé dont la densité de chaque couche est inférieure à celle du dessous et supérieure à celle du dessus.

Lors de travaux préliminaires, nous avions observé que l'introduction sur la surface du gradient du produit à purifier, préalablement dialysé contre le tampon phosphate plus saccharose à 5 %, engendrait des perturbations dans les couches supérieures du gradient.

Pour obtenir un anneau net au dessus du gradient, nous avons dialysé contre le tampon phosphate exempt de saccharose.

Nous avons toujours travaillé à + 4°C en gradient iopycnique, en utilisant, comme déjà signalé, le rotor SW 25 de la centrifugeuse Spinco modèle L et en centrifugeant 45 heures environ, la vitesse de rotation étant de 25.000 tours/minute.

Les accélérations sont les suivantes :

- 37.000 g au haut du tube
- 63.500 g au milieu du tube
- 90.100 g au fond du tube

Dans cet essai préliminaire, on a déposé 2 ml d'hémolysine préalablement purifiée par chromatographie.

3) Résultats

Prélèvement du gradient :

On place le tube de cellulose dans un support et on en perfore le fond à l'aide d'une aiguille hypodermique à biseau court de 8/10ème de mm de diamètre, contenant son mandrin à l'intérieur.

On place dessous une série de tubes destinés à recevoir les fractions. Puis on enlève le mandrin.

Pour éviter la fuite de liquide qui se produirait autour de l'aiguille, nous avons appliqué, avant perforation, un carré de sparadrap de 1 cm de côté sur le fond du tube, cette substance constitue un joint efficace et l'écoulement désiré se produit uniquement à travers l'aiguille.

Le calibre de l'aiguille est choisi en fonction de la viscosité du

produit : plus petit, l'écoulement est trop lent, plus gros, trop rapide.

Ce débit augmente au cours du prélèvement, la viscosité diminuant au fur et à mesure que diminue la concentration en saccharose.

L'aiguille à biseau court est placée de telle façon que l'ouverture se trouve au-dessus du précipité rassemblé au fonc du tube. Grâce à ce biseau court, le prélèvement est effectué sur une couche mince de liquide.

En prélevant 15 gouttes par tube, on obtient 28 fractions en partant d'un gradient de 30 ml plus 2 ml de produit.

On détermine la densité optique de chaque fraction à 280 m en prenant comme blanc, et ce pour tenir compte des impuretés du saccharose, la densité optique de la fraction séparée correspondante sur un gradient analogue, mais dans lequel on a substitué aux protides 2 ml de tampon phosphate, la centrifugation ayant été réalisée de la même façon. La différence entre les deux densités donne la densité propre aux protéïnes de la fraction considérée et on peut ainsi tracer la courbe de teneur en protides des diverses fractions.

En vue de l'établissement de la courbe relative à l'hémolysine, on dilue tout d'abord au 1/20 ème les diverses fractions dans le tampon de Mayer, car ces solutions ont un titre trop élevé pour pouvoir être utilisées directement. Puis, on effectue la réaction sur 0,05 ml de solution diluée. (Fig. 9).

On observe deux pics sur la courbe de teneur en protéïnes : celui correspondant au fond du tube est relatif aux macroglobulines 19 S, et l'autre à un niveau supérieur se rapporte aux globulines 7 S.

Dans le premier pic, les protéïnes sont en équilibre avec une solution de saccharose de d = 1,112 et dans le deuxième d = 1,06.

Ces deux pics sont donc bien séparés.

L'hémolysine est rassemblée dans les fractions du fond renfermant les macroglobulines 19 S.

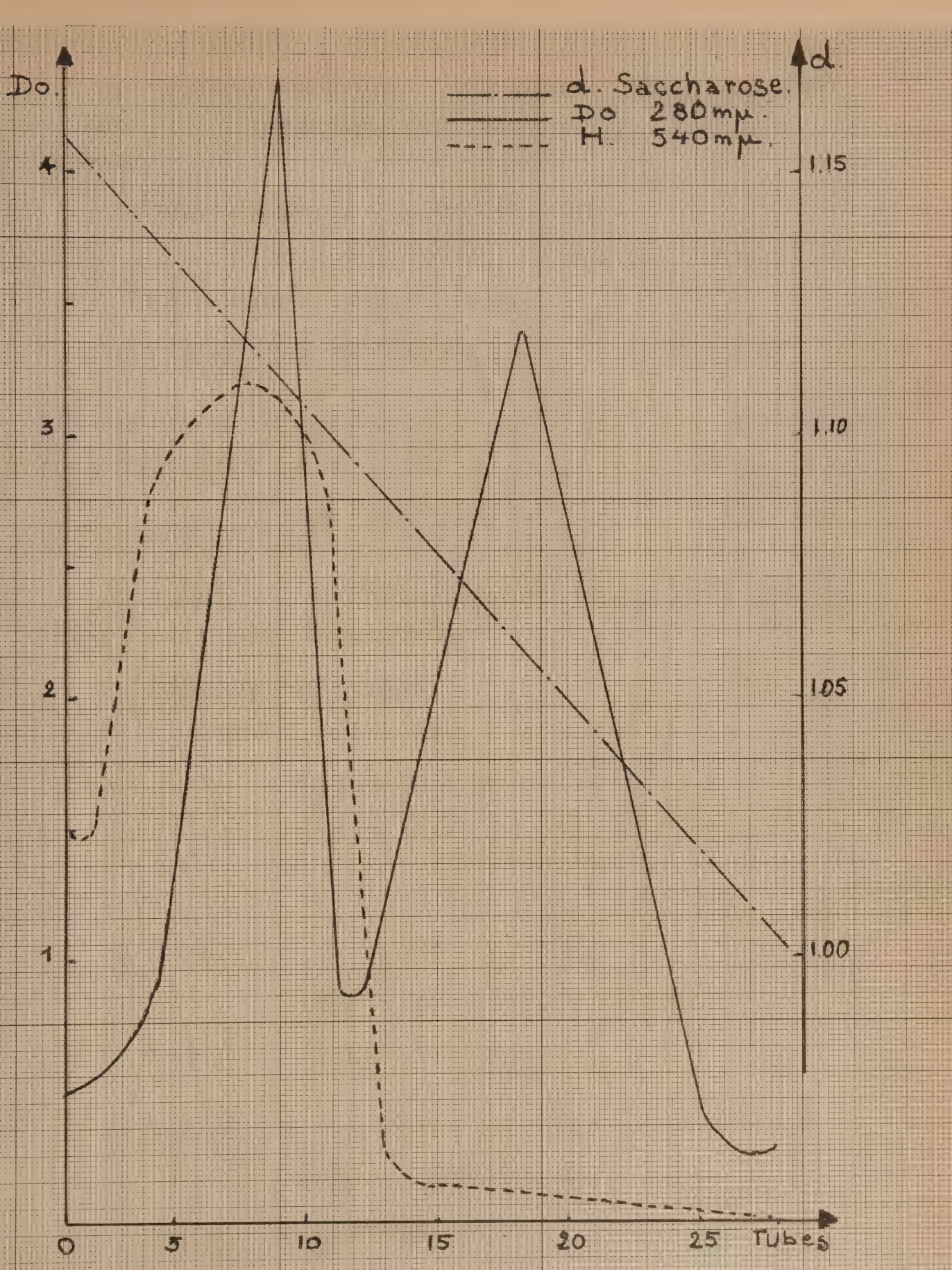

Do.
d.
d. Saccharose.
Do 280mμ.
H. 540mμ.
4
3
2
1
1.15
1.10
1.05
1.00
0
5
10
15
20
25
Tubes

Fig. 9

Le dosage de l'agglutinine de lapin anti-mouton a été effectué sur les tubes 9 et 19 : sommets respectifs de chaque pic. On utilise 0,1 ml de produit.

On obtient : Tube n° 9 : 256 U.A.

Tube n° 19 : 4 U.A.

Le tube 9 contient 0,55 mg N par ml.

On a : $\frac{256 \text{ U.A.}}{0,55} \simeq 465$ U.A. par mg N

On constate donc que l'hémolysine et l'hémagglutinine sont rassemblées conjointement dans le pic 19 S ; ce qui correspond à l'observation de KOYAMA (39) qui obtient l'agglutinine en même t mps que l'hémolysine 19 S en chromatographie sur D.E.A.E. cellulose.

En résumé, on a donc obtenu une macroglobuline 19 S contenant à la fois l'hémolysine et l'hémagglutinine.

- Purification de l'hémolysine

On l'a effectuée sur les tubes 7 - 8 - 9 et 10

Tube n° 7 : 8.800 U.H. 50 % par ml et Do 280 = 2,8

Tube n° 8 : 10.400 U.H. 50 % par ml et Do 280 = 3,4

Tube n° 9 : 13.200 U.H. 50 % par ml et Do 280 = 4,4

Tube n° 10 : 9.200 U.H. 50 % par ml et Do 280 = 2,36

a) Tube n° 7 : 2,80 x 0,1248 = 0,349 mg N par ml

$\frac{8.800}{0,349}$ = 25.000 U.H. 50 % par mg N

Coefficient de purification : $\frac{25.000}{2.000}$ = 12,5

b) Tube n° 8 : 3,4 x 0,1248 = 0,424 mg N par ml

$\frac{10.400}{0,424}$ = 24.500 U.H. 50 % par mg N

Coefficient de purification : $\frac{24.500}{2.000}$ = 12,2

c) Tube n° 9 : 4,40 x 0,1248 = 0,549 mg N par ml

$$\frac{13.200}{0,549} = 24.000 \text{ U.H. } 50\ \% \text{ par mg N}$$

Coefficient de purification : $\frac{24.000}{2.000} = 12$

d) Tube n° 10 : 2,36 x 0,1248 = 0,294 mg N par ml

$$\frac{9.200}{0,294} = 31.200 \text{ U.H. } 50\ \% \text{ par mg N}$$

Coefficient de purification : $\frac{31.200}{2.000} = 15,6$

Le produit déposé sur le gradient titrant 17.000 U.H. 50 % par mg N, la purification du gradient est de :

$$\frac{31.000}{17.000} \neq 2$$

La mise en oeuvre de ce gradient ayant donné un très bon résultat, nous avons utilisé cette technique pour la poursuite des travaux de purification.

II - PURIFICATION DE L'HEMOLYSINE SUR GRADIENT DE CENTRIFUGATION

Le produit de départ est le concentré correspondant au premier pic obtenu dans la chromatographie de globuline 50 % sur Sephadex G 200.

On prépare un gradient préformé de saccharose en tampon phosphate 0,01 M. On dépose 6 ml de protides sur chaque tube, soit en tout 18 ml.

Après centrifugation, on recueille les fractions comme précédemment, On rassemble celles se rapportant au pic du fond de chaque tube ; on les dialyse en eau physiologique tamponnée jusqu'à élimination totale du saccharose.

- Résultats

On obtient en fin de dialyse 50 ml de produit de densité optique 21,5 à 280 mμ et de titre hémolytique 48.000 U.H. 50 % par ml, soit :

21,5 x 0,1248 = 2,68 mg N par ml

$$\frac{48.000}{2,68} = 17.900 \text{ U.H. 50 \% par mg N}$$

Coefficient de purification : $\frac{17.900}{2.000} \neq 9$

et par rapport au produit de départ :

$$\frac{17.900}{13.000} \neq 1,4$$

Ce résultat est inférieur à celui enregistré précédemment, mais cette différence peut facilement s'expliquer par le fait que l'on a opéré sur un volume de produit à purifier trois fois plus important, multipliant ainsi les risques de contamination.

D'autre part, nous avions congelé ce produit : un insoluble est apparu à la décongélation qui a, à la centrifugation, quelque peu perturbé le gradiant.

- Rendement hémolytique

Etant parti de 18 ml de titre 140.000 U.H. 50 % par ml, soit au total $2,52 \times 10^6$ U.H. 50 % par ml, et ayant recueilli après dialyse 50 ml titrant 58.000 U.H. 50 % par ml, soit au total $2,4 \times 10^6$ U.H. 50 %, le rendement est de 95 % environ en hémolysine, donc très bon malgré cette précipitation.

Ces 50 ml de produit sont de nouveau concentrés sur ultra-filtre au Parlodion pour être recyclés sur un gradient analogue. On obtient ainsi 15 ml de protides qui sont déposés par fractions de 5 ml sur chacun des trois tubes et centrifugés de la même façon (45 heures).

On isole à nouveau les fractions donnant le pic inférieur. On constate cette fois-ci que le pic surnageant est très faible, ce qui indique une bonne purification.

Le pic du fond rassemblé est dialysé contre de l'eau physiologique tamponnée, pour éviter la précipitation en restant à l'isotonie et à pH 7,0 jusqu'à élimination totale du saccharose.

On vérifie l'absence de saccharose dans le liquide de dialyse en l'hydrolysant au préalable en milieu acide puis en faisant agir la liqueur de Fehling.

- Etude approchée de la purification

Le produit final obtenu est de titre 90.900 U.H. 50 % par ml et de densité optique à 280 m 21,5.

$$21,5 \times 0,1248 = 2,68 \text{ mg N par ml}$$

$$\frac{99.900}{2,68} = 37.000 \text{ U.H. 50 \% par mg N}$$

$$\text{Purification : } \frac{37.000}{2.000} = 18,5$$

ce qui est un bon résultat.

Seule la chromatographie sur hydroxylapatite nous avait donné un meilleur résultat, mais nous avons vu que ce procédé ne permettait pas d'obtenir une quantité de produit suffisamment importante pour permettre d'en faire une analyse ultérieure.

L'emploi du coefficient 0,1248 pour le calcul de la quantité de protéïnes ne donnant qu'une valeur approximative, nous avons effectué le dosage des protéïnes pour calculer avec plus de précision le coefficient de purification finale.

Il est à signaler, ici, que nous n'avons pas eu recours à la méthode de choix de séparation des glycoprotéines qu'est la précipitation à l'acide phytique, mise au point par COURTOIS, (bibliographie : Thèse d'Agneray (83)) et qui élimine toutes les protéines sauf les glycoprotéines.

Notre but est de séparer une protéine biologiquement active, hors la précipitation phytique se faisant à pH 2,1, nous avons constaté, dans l'étude de la résistance de l'hémolysine en fonction du pH, que celui de 2,1 provoque une disparition totale de l'activité hémolytique.

oOo

QUATRIEME PARTIE

ANALYSE DE L'HEMOLYSINE 19 S

On a effectué sur l'hémolysine préparée dans la partie précédente les déterminations suivantes :

- Tout d'abord un dosage de protéines destiné à évaluer son coefficient de purification.

- Puis une électrophorèse sur acétate de cellulose, certaines bandes étant soit colorées pour situer les protéines, soit éluées pour détecter l'activité hémolytique, d'autres étant colorées pour identifier les glycoprotéines.

- On fait agir sur l'hémolysine la neuraminidase pour détacher par ce moyen enzymatique l'acide sialique.

- On procède ensuite à la détermination des oses liés à l'hémolysine : hexoses, hexosamines, fucose, acides hexuroniques et acide sialique.

- Le résultat obtenu est comparé successivement à ceux du sérum total puis de l'Orosomucoïde et enfin à deux glyco-protéines 19 S sériques.

A / DOSAGE DE PROTEINES

Nous n'avons pas utilisé la technique classique au biuret qui aurait nécéssité la mise en oeuvre d'une quantité trop importante de produit. Aussi avons nous retenu le micro-dosage de LOWRY (68), utilisant le réactif de FOLIN et CIOCALTEU (69).

1) Préparation du réactif de FOLIN

On mélange et fait bouillir à reflux pendant 10 heures :

100 g de tungstate de sodium
25 g de molybdate de sodium
700 ml d'eau
50 ml d'acide phosphorique (d = 1,75) et
100 ml de HCl concentré

puis on ajoute :

150 g de sulfate de lithium
50 ml d'eau
quelques gouttes de brome

et reporte à reflux 15 minutes.

La solution jaune est refroidie, diluée à 1 litre et conservée en flacon coloré. On la titre par la soude normale et la dilue pour l'ajuster à une acidité normale.

Ce réactif donne une réaction colorée avec la tyrosine contenue dans le protide à doser.

La technique de Lowry nécessite la mise en oeuvre des réactifs suivants :

Réactif A : solution à 2 % de $Na_2 CO_3$ dans Na OH 0,1
Réactif B : solution à 5 % de sulfate de cuivre dans 1 % de tartrate de sodium.
Réactif C : solution alcaline cuivrique : 50 ml de A plus 1 ml de B (conservation 24 heures)

Réactif D : le même que le précédent mais sans NaOH

Réactif E : réactif de Folin dilué pour être N.

L'étalonnage a été effectué en même temps que la réaction sur une globuline de boeuf, pure, préparée par Monsieur DELSAL, dont on a fait une solution à 500 µg par ml.

2) Dosage

On a précipité 0,05 ml de protéine à doser par 10 ml d'acide trichloracétique à 5 % pendant 24 heures.

On rassemble ce précipité par centrifugation, on élimine le surnageant et on le dissout dans la soude N.

On traite de la même façon la gamme d'étalonnage, le précipité et le blanc.

On met en contact le protide avec 4 ml de réactif C pendant 1 heure, puis on ajoute 0,5 ml de Folin.

Après 30 minutes, on détermine la densité optique à 750 mµ au spectrophotomètre Beckman D.U. qui est de 1,450. En se référant à celle des étalons, on en déduit une teneur de 0,407 mg de protéïne dans 0,05 ml, soit 8,14 mg par ml.

3) Calcul de la purification en fonction du dosage de protéines

Le même dosage sur le sérum hémolytique de départ a donné 47 mg de protéines par ml pour un titre de 20.000 U.H. 50 % par ml.

Soit : $\frac{20.000}{47}$ = 425 U.H. 50 % par mg de protéines

L'hémolysine préparée titre 99.900 U.H. 50 % par ml et contient 8,14 mg de protéines par ml.

$$\frac{99.900}{8,14} = 12.300 \text{ U.H. 50 \% par mg de protéines}$$

La purification finale du produit est donc de :

$$\frac{12.300}{425} = 29$$

L'emploi du coefficient 0,1248 avait conduit à un résultat bien différent, de 18,5 pour la purification.

Ainsi que nous l'avions signalé, ce résultat n'était qu'approximatif : ce coefficient ne s'applique en effet qu'aux protides totaux contenant albumines et globulines.

Au fur et à mesure de la purification, on isole des protides mieux définis auxquels doivent correspondre des coefficients différents pour le calcul de leur teneur en azote.

Il est à noter que cette purification de 29 doit être en réalité bien plus élevée.

Elle a été calculée sur le dernier produit qui a subi à la fois le dosage de protéine et le dosage d'hémolysine.

Mais à chaque manipulation, une baisse de l'activité biologique se produit qui amenuise le titre hémolytique et qui est plus importante que la dénaturation protéique.

Cette dénaturation est d'autant plus importante que le produit est plus pur. Si donc, on avait déterminé ce titre hémolytique sur la matière première puis dosé les protides en fin de purification, le coefficient aurait été plus important.

B / ELECTROPHORESE DE PROTEINES SUR ACETATE DE CELLULOSE

Nous avons contrôlé par électrophorèse le produit obtenu par la purification précédente : c'est-à-dire une chromatographie sur Sephadex G 200, puis deux centrifugations graduelles.

Nous avons utilisé l'acétate de cellulose préconisé par SCHERR (70). On obtient par ce procédé une résolution qui est meilleure que celle obtenue sur papier, mais inférieure à celle sur gel d'amidon, donc intermédiaire entre les deux.

D'autre part, la migration est plus rapide que sur papier.

Nous avons utilisé des bandes d'acétate de cellulose de 2,5 cm sur 17 cm de fabrication CHEMETRON.

Le tampon d'imprégnation des bandes et de contact dans les cuves est du véronal 0,07 M à pH 8,6 obtenu par mélange de :

- acide diéthylbarbiturique 1,66 g
- diethylbarbiturate de sodium 12,76 g
- eau q.s.p. 1000 ml

Les bandes sont conservées en méthanol dilué au demi.

La veille, on les trempe dans le tampon précédent.

Au moment de l'emploi, on place les bandes entre deux feuilles de filtre épais et presse délicatement pour absorber le liquide de surface.

On repère la face opaque de la bande. On y dépose 0,03 ml de produit en une zone sensiblement médiane mais légèrement décalée vers l'anode.

On place les bandes sur le porte bandes, l'extrémité plongeant dans le tampon. La partie tendue sur le pont est utilisée pour la migration.

On attend que le protide ait pénétré dans la bande.

On applique aux bornes une tension de 110 volts, l'intensité étant de 5 m A.

La cuve doit être une chambre humide et hermétique.

Au bout de trois heures, on retire les bandes. On en utilisera une partie pour une expérience ultérieure.

Certaines sont colorées à l'Amidoschwartz de formule suivante :

- Amidoschwartz 0,5 g
- alcool méthylique 40 ml
- eau 50 ml
- acide acétique 10 ml

On laisse exactement une minute dans ce bain.

Puis, on décolore par bains successifs de composition suivante :

- alcool méthylique 350 ml
- eau 500 ml
- acide acétique 70 ml
- diacétone alcool 80 ml

On poursuit jusqu'à ce que le fond soit blanc. L'emploi de diacétone alcool est indispensable pour éviter que les bandes soient cassantes.

Ensuite, on déshydrate les bandes pour les rendre transparentes et les conserver. Pour ce faire, on applique sur une plaque de verre en évitant la formation de bulles entre le support et l'acétate de cellulose, puis on chauffe sous infra-rouge jusqu'à ce que la bande soit transparente.

On laisse refroidir, puis on décolle du verre.

On obtient deux bandes principales et deux bandes beaucoup moins importantes. (Fif. 10).

On a préparé de la même façon l'électrophorèse du sérum hémolytique brut.

On constate que les deux bandes moins importantes se trouvent au niveau des δ globulines.

Les deux bandes principales migrent plus loin que ces γ globulines.

Les deux bandes sont formées de macroglobulines.

FLODIN (60) en analysant dans sa thèse (p. 70) les produits de filtration sur Sephadex G 200 correspondant au premier pic, obtient pour ces macroglobulines un résultat comparable au nôtre en utilisant l'électrophorèse sur papier.

Après coloration, et sans attendre, pour éviter la diffusion des protides, on a juxtaposé une bande colorée et une non colorée . On découpe la bande non colorée pour en isoler 4 fragments, correspondant respectivement aux deux bandes principales et aux deux bandes moins importantes.

Chaque fraction ainsi séparée est maintenue pendant 24 heures à 4°C dans 1 ml de tampon de Mayer, pour y faire diffuser les protides.

On reprend 0, 5 ml de tampon provenant de chaque fraction pour y détecter la présence d'hémolysine.

Pour ce faire on leur ajoute 0, 5 ml d'hématies de mouton diluées au 1/56ème et 0, 5 ml de complément au 1/20ème et on porte à 37°C.

On obtient rapidement une hémolyse totale avec les deux fractions correspondant aux deux bandes importantes.

On a donc par la succession d'une chromatographie sur Sephadex G 200 et de deux gradients de centrifugation isopycniques en saccharose, obtenu une macroglobuline donnant deux protides à l'électrophorèse sur acétate de cellulose, qui sont tous deux de l'hémolysine.

Ceci avait déjà été présenté par STELOS (15), qui a caractérisé en électrophorèse sur gel d'amidon à pH 8, 6 les hémolysines suivantes :

- une 6 S de mobilité électrophorétique - 1, 2 μ qui est une hémolysine surtout d'immunisation tardive.
- une 18 S de mobilité électrophorétique - 2, 1μ qui est une hémolysine surtout d'immunisation rapide.

- une autre 18 S également de mobilité électrophorétique - 1,7μ aussi d'immunisation rapide.

Cette dernière hémolysine est donnée sous réserve dans la publication de Stelos comme 18 S. Pour notre part, nous pensons qu'il s'agit bien de 19 S (ou 18 S selon les auteurs : les deux chiffres indiquant le même protide), car cette hémolysine a été séparée par gradient de centrifugation dans le pic du fond du tube.

L'hémolysine que nous avons préparée est donc une hémolysine 19 S, mais donnant en électrophorèse deux protides également hémolytiques, mais de mobilité différente.

C - ELECTROPHORESE DE GLYCOPROTEINES SUR ACETATE DE CELLULOSE.

Une technique classique d'électrophorèse de glycoprotéines est celle de BISERTE (84).

Elle se fait à pH 3, 9 en milieu pyridinique : ces deux raisons nous empêchent de l'utiliser car elles sont incompatibles avec l'activité biologique de l'hémolysine, aussi, avons nous suivi la même technique de migration que pour les protéines dans le chapitre précédent, ce qui, de plus, nous permet des comparaisons intéressantes.

Nous avons donc effectué l'électrophorèse des glycoprotéines sur acétate de cellulose en utilisant le mode opératoire décrit pour les protides. Parallèlement, et pour comparer les résultats, nous avons fait en même temps une électrophorèse de protéines.

La quantité déposée sur la bande pour glycoprotéines était double de celle mise en oeuvre pour la bande des protéines. Comme précédemment, la migration s'est faite dans le même tampon pH 8, 7 pendant trois heures sous une tension de 110 Volts et une intensité de 5 m A. La bande de protéines a été colorée à l'Amidoschwartz puis rendue transparente.

La bande de glycoprotéines est, au sortir de la cuve, plongée cinq minutes dans l'alcool à 96° pour la fixer.

On procède ensuite à l'oxydation périodique des oses des glycoprotéines en portant trois minutes dans le bain extemporané suivant :

- solution stock d'acide periodique à 50 % 0, 6 ml
- eau distillée 12 ml

- solution d'acétate de sodium à 20 % 0,6 ml
- alcool éthylique à 96° 30 ml

Puis on lave abondamment à l'eau pendant cinq minutes, la réaction de coloration intervenant en plaçant pendant vingt minutes dans le réactif de Schiff qui colore en rose les oses oxydés et dont la préparation est la suivante :

- fuschine Merck 2 g
- eau distillée à 90°C 400 ml

Agiter, refroidir à 50°C puis ajouter :

- métabisulfite de potassium 4 g
- HCl 2 N 10 ml

Laisser 12 heures à + 4°C. Puis ajouter du charbon actif, laisser en contact dix minutes et filtrer.

On obtient un produit incolore auquel on ajoute 10 ml de HCl 2N et on conserve à 4°C à l'abri de la lumière.

Après coloration, on décolore par bains successifs pendant au moins trente minutes, dans la solution suivante :

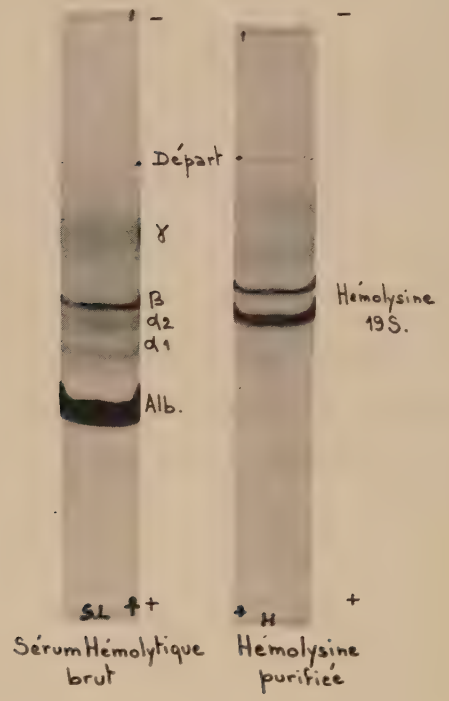
- métabisulfite de potassium 4 g
- eau distillée 1.000 ml
- HCl concentré 10 ml

Il est à signaler que cette technique de glucidogramme, même si on fait agir sur les bandes le diacétone alcool, se prête mal à la déshydratation qui rend les protéinogrammes translucides, aussi avons nous été obligés de photographier le glucidogramme humide et opaque sur plaque de verre. (Fig. 10 bis)

Résultats

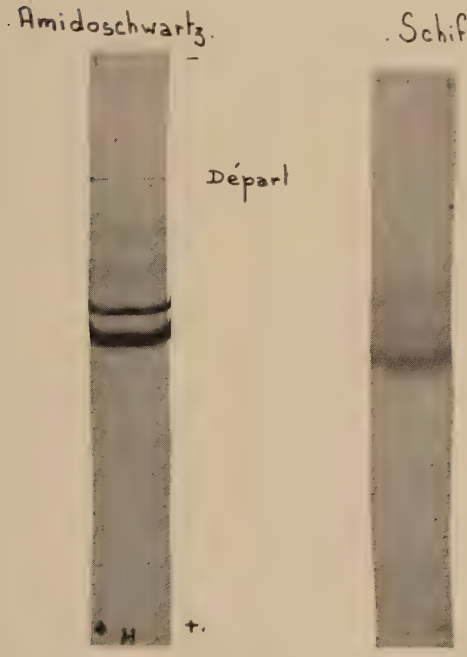
La coloration à l'Amidoschwartz de la bande protéique est semblable à celle observée lors de la première électrophorèse de protides du

Electrophoreses Sur Acétate de Cellulose.



Sérum Hémolytique brut — Hémolysine purifiée

Electrophoreses Sur Acétate de Cellulose.



Hémolysine purifiée. — Hémolysine purifiée.

chapitre précédent et ce, malgré un temps de conservation prolongé du produit à - 30°C et de l'intervalle de temps entre ces deux séries de manipulations.

On observe sur le glucidogramme deux bandes principales correspondant aux deux bandes importantes de protéines et une bande secondaire correspondant à la bande secondaire des protéines, la plus proche des principales.

Dans le chapitre précédent, nous avions élué et trouvé dans les deux bandes principales protéiques deux hémolysines, tout comme l'avait indiqué STELOS (15). Au niveau de ces deux bandes, nous venons de caractériser des glycoprotéines. Nous en concluons que les hémolysines 19 S sont bien deux glycoprotéines.

D - ACTION DE LA NEURAMINIDASE SUR L'HEMOLYSINE PURIFIEE

Notre but était, pour prouver que l'hémolysine est une glycoprotéine, d'en détacher l'acide sialique par la neuraminidase et ainsi de détruire son activité biologique. La neuraminidase a été choisie car c'est la seule osidase facilement accessible.

Son nom, dans la classification des enzymes est :
N - acétyl - neuraminate - glycohydrolase (3 - 2 - 1 - 18) (85).
C'est une glucoside hydrolase.

Nous avons utilisé une neuraminidase brute préparée par culture de vibrion cholérique souche 4 z.

Nous avons vérifié et titré son activité selon BOYER (86). La définition de l'unité de neuraminidase est la suivante : Une unité hydrolyse 1 µg d'acide sialique en 15 minutes à 37°C à partir d'une glycoprotéine (d'origine urinaire) en solution dans 1 ml auquel on ajoute l'enzyme et complète à 2 ml par tampon d'acétate pH 5, 5 et 0, 1 M.

Nous avons personnellement fait agir la neuraminidase sur une glycoprotéine titrée en acide sialique (N B C) et dosé cet acide selon AMINOF (78).

L'enzyme utilisé s'est montré très actif (500 unités par ml). L'hémolysine étant en tampon phosphate et en présence de Merthiolate, on élimine ces produits par dialyse .

On fait agir sur l'hémolysine ainsi dialysée et dans les mêmes conditions opératoires que pour le dosage précédent, la neuraminidase. Puis, on effectue le titrage hémolytique sur le produit ainsi traité.

Nous avons ainsi constaté au cours de plusieurs déterminations successives, que l'activité hémolytique n'était pas modifiée après traitement à la neuraminidase. Dans les mêmes conditions, après action de la neuraminidase, nous avons titré l'acide sialique libéré. La quantité de produit ainsi obtenue, est infime et peut correspondre à la bande de glycoprotéine non hémolytique à l'électrophorèse.

Donc, la neuraminidase est sans aucune action sur l'hémolysine : ne provoquant ni diminution du titre, ni libération d'acide sialique.

Si l'on se reporte aux travaux de GOTTSCHALK (87), la neuraminidase ne coupe l'acide sialique que s'il est en position terminale de l'extrémité non réductrice. On peut déduire que l'acide sialique de l'hémolysine (titré plus loin) n'occupe pas cette position.

E / DETERMINATION DES OSES DE L'HEMOLYSINE

I - DOSAGE D'HEXOSES

Deux réactions sont communément utilisées pour titrer les hexoses : celle à l'orcinol et celle au tryptophane, cette dernière donnant une coloration violette en présence d'acide borosulfurique.

Nous avons préféré utiliser cette dernière méthode pour les raisons suivantes :

- la solution de tryptophane se conserve plusieurs jours dans la glace.
- la température de la réaction est plus facile à obtenir : bain-marie bouillant et non 80°C.
- la coloration développée est moins perturbée par les impuretés des réactifs.

Pour effectuer cette réaction de SHETLAR (71), nous avons suivi la technique de BADIN (72).

1) Réactifs :

- Acide borosulfurique : de composition :

Acide sulfurique	770 ml
Eau	230 ml
Acide borique	50 g

- Solution de l-tryptophane à 1 % : on prélève la forme l plus soluble. On dissout à l'ébullition.

- Standard : solution à 100 µg par ml ou 100 mg par litre de d-galactose anhydre, chromatographiquement pur "MANN".

2) Réaction

On effectue simultanément l'étalonnage et le dosage.

On étalonne avec 20, 40, 60 et 80 µg de galactose, et réalise le dosage sur des prises de 0,05 et 0,1 ml de protéines.

On isole le protide par précipitation à l'alcool absolu.

On centrifuge et conserve le culot que l'on remet en suspension dans 1 ml d'eau.

On ne dose ainsi que les hexoses protéiques.

A l'étalon (sous un volume de 1 ml) et à la protéine, on ajoute 3,5 ml d'acide borosulfurique, on agite et porte immédiatement au bain de glace pendant 5 minutes.

Après avoir laissé 15 minutes à la température du laboratoire, on ajoute 0,5 ml de la solution de tryptophane et on mélange. On refroidit, puis on porte 15 minutes à 100°C. Les tubes sont alors refroidis au bain d'eau et on effectue les lectures au spectrophotomètre en cuves de 1 cm d'épaisseur à 520 mμ après 15 minutes.

On remarque qu'au stade refroidissement, celui-ci ne doit pas être trop rapide ni dépasser la durée de 15 minutes, pour éviter une cristallisation.

La teneur de l'hémolysine purifiée est de :

780 μg d'hexoses par ml.

Etant donné qu'elle renferme, ainsi que nous l'avons déterminé précédemment, 8,14 mg de protéine par ml, ces dernières contiennent :

$$\frac{780}{8,14} = \underline{95,8 \text{ μg d'hexoses par mg de protéine.}}$$

II - DOSAGE D'HEXOSAMINES

Nous avons utilisé la méthode d'ELSON et MORGAN selon le protocole opératoire de RONDLE (73), basée sur la réaction colorée produite en milieu alcalin à 100°C entre une solution de sucre aminé et l'acéthyl acétone que l'on révèle colorimétriquement par le p-diméthylaminobenzaldéhyde en milieu acide.

1) Réactifs :

- Réactif à l'acéthyl acétone: mélange effectué extemporanément de 1 ml d'acéthyl acétone purifié par distillation sous pression réduite avec 50 ml de Na_2CO_3 0,5 N. Ce réactif n'est stable que 2 à 3 heures à 18°C.

- Ethanol absolu redistillé.

- Réactif d'EHRLICH : 0,8 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde purifié selon ADAMS (74), dissous dans 30 ml d'éthanol absolu et addition de 30 ml de HCl d : 1,18. On obtient une solution sans insoluble de couleur jaune pâle, que l'on conserve à - 10°C.

- Standard : solution à 100 µg par ml de glucosamine base, préparée par dissolution de 120,3 mg pour 100 ml de chlorhydrate d-glucosamine chromatographiquement pur "MANN".

2) Réaction

Comme dans le dosage des hexoses, on sépare tout d'abord les protéines par précipitation à l'alcool absolu.

La réaction ne peut se faire que sur les hexosamines libres : ce qui nécessite au préalable une hydrolyse pour les libérer.

Nous avons déterminé la durée optimum de cette hydrolyse sur une globuline de cobaye purifiée par chromatographie.

Après précipitation à l'alcool, on ajoute 1 ml de HCl 2 N au précipité et on le maintient au bain-marie à 100°C pendant des durées variables échelonnées de 15 en 15 minutes, puis on effectue la réaction sur cet hydrolysat.

Le maximum de coloration est obtenu au bout de 2 heures 15. Ce qui est très voisin des deux heures généralement utilisées.

Au délà de cette durée, l'importance de la coloration décroît par décomposition des hexosamines libérées à l'hydrolyse.

Pour effectuer le dosage, on précipite 0,05 ml, 0,1 ml et 0,2 ml d'hémolysine à l'alcool absolu. On ajoute au précipité 1 ml de HCl 2 N et on porte 2 heures 15 à 100°C.

On refroidit puis on ajoute à chaque tube une goutte de solution de phénol-phtaléïne et neutralise par NaOH N jusqu'à coloration rose ; ensuite, on décolore par HCl 0,3 N. On est alors au pH convenable pour poursuivre la réaction, celle-ci s'effectuant à pH acide, la phénolphtaléïne sera sans action sur la coloration finale rose.

La réaction est faite à la fois sur les protéïnes hydrolysées et sur les étalons.

A 1 ml de solution, on ajoute 1 ml du réactif à l'acéthyl acétone et on porte 20 minutes à l'ébullition, puis on refroidit.

On ajoute alors 1 ml de réactif d'Ehrlich et on ajuste à 5 ml par l'alcool absolu. On agite.

On porte 10 minutes à 65 - 70°C pour dégager le CO_2.

On refroidit et lit à 530 mμ en cuve de 1 cm au spectrophotomètre.

Par comparaison aux étalons, on dose 373 μg d'hexosamines par ml d'hémolysine à 8,14 mg de protéines par ml, soit :

$$\frac{373}{8,14} = \underline{45,8\ \mu g \text{ d'hexosamines par mg de protéïne.}}$$

III - DOSAGE DE FUCOSE

Nous avons utilisé la méthode de DISCHE, reprise par WINZLER (75), basée sur la coloration jaune obtenue en milieu sulfurique avec la cystéine.

1) Réactifs :

- Alcool à 95°
- Acide sulfurique hydraté : 6 volumes d'acide sulfurique pur, plus 1 volume d'eau.

- Réactif à la cysteïne : solution à 3 % de chlorhydrate de l-cysteïne.

- Etalon de méthyl pentose : à 20 µg par ml de l-fucose "Light".

- Soude décinormale.

2) Réaction

On précipite tout d'abord 0,1 ml de protide par 5 ml d'alcool à 95° .

On isole le précipité par centrifugation, on le remet en suspension dans de l'alcool, et le recentrifuge pour le laver.

On décante le surnageant et retourne pour égoutter le liquide ; ainsi, le fucose dosé est uniquement celui de la protéine.

Le précipité est solubilisé dans 1 ml de soude décinormale. La réaction est alors effectuée en même temps sur le protide et l'étalon de 20 µg dans 1 ml.

On ajoute à la solution maintenue au bain de glace, 4,5 ml du réactif sulfurique également refroidi. Cette condition de température est indispensable pour obtenir la coloration.

Puis, on porte 3 minutes exactement au bain-marie bouillant et on refroidit ensuite sous un courant d'eau.

On ajoute alors 0,1 ml de réactif à la cystéine et mélange immédiatement.

Dans le but de pouvoir défalquer les colorations non spécifiques du fucose, on prépare un blanc comme ci-dessus, à l'exception de l'introduction finale de cystéine.

Bien que Winzler indique d'effectuer la colorimétrie 60 à 90 minutes après l'addition de la cystéine, nous avons constaté que l'on atteint un palier vers la 30ème minute.

Les lectures sont faites au spectrophotomètre en cuve de 1 cm, contre de l'eau distillée aux longueurs d'onde de 396 mµ et 430 mµ qui

correspondent respectivement aux maximum et minimum le plus proche du spectre du fucose.

Pour le calcul de la teneur en fucose, si Do 396 et Do 430 sont les densités optiques de la solution de protéine à analyser, on applique la formule suivante :

$$\frac{(\text{Do } 396 - \text{Do } 430) - (\text{Do blanc } 396 - \text{Do blanc } 430)}{(\text{Do standard } 396 - \text{Do standard } 430)} \times 0,02 \times 1000 = \text{mg de fucose pour } 100 \text{ ml}$$

Soit pour le cas présent :

$$\frac{(0,488 - 0,325) - (0,131 - 0,088)}{(0,419 - 0,095)} \times 0,02 \times 1000 = 7,4 \text{ mg de fucose \%.}$$

La teneur en protéines de l'hémolysine étant de 8,14 mg par ml :

$$\frac{74}{8,14} = 9,09 \text{ ou } 9,1 \mu\text{g de fucose par mg de protéines.}$$

IV - DOSAGE D'ACIDES HEXURONIQUES

Nous avons utilisé la méthode de DISCHE (76), donnant avec les acides hexuroniques une coloration rose en présence de carbazol.

1) Réactifs :

- Acide sulfurique pur
- Solution de carbazol (purifié par recristallisation) à 0,1 % dans l'alcool absolu.
- Standard à 100 µg par ml d'acide galacturonique dans l'acide sulfurique pur.

2) Réaction

On précipite 0,5 ml d'hémolysine par l'alcool absolu, on centrifuge le précipité, on remet en suspension dans une autre quantité d'alcool et recentrifuge pour le laver.

Le précipité est remis en suspension dans 1 ml d'acide sulfurique. Les étalons sont, eux aussi, amenés à un volume de 1 ml.

On ajoute 6 ml d'acide sulfurique, on mélange et porte 20 minutes à l'ébullition, puis on refroidit.

On ajoute 0,2 ml de réactif au carbazol ; on agite et laisse se développer la coloration deux heures à l'obscurité.

On prépare un blanc sans carbazol pour éliminer les colorations parasites.

On lit, après ces deux heures, au spectrophotomètre à 530 mμ en cuve de 1 cm d'épaisseur.

En se rapportant à l'étalonnage, on obtient :

25 μg par ml de solution.

Soit, par rapport aux protéines :

$$\frac{25}{8,14} = 3\ \mu g \text{ par mg de protéine.}$$

Cette valeur est faible mais normale pour une glyco-protéine d'origine sérique. Etant donné que les bactéries sont riches en acides hexuroniques, le résultat de ce dosage montre l'absence de contamination bactérienne du protide.

V - DOSAGE D'ACIDE SIALIQUE

De très nombreuses techniques de dosage de l'acide sialique ont été proposées, mais elles n'étaient pas spécifiques et nécessitaient soit un isolement préalable du produit par chromatographie, soit une lecture à différentes longueurs d'ondes pour déduire les colorations non spécifiques.

WARREN (77) établit une méthode de dosage de l'acide sialique dans laquelle, par oxydation avec l'acide periodique, conduit à l'acide β -formyl-pyruvique qui se condense à l'acide thiobarbiturique avec production d'une coloration rose extractible par un solvant.

Nous avons utilisé un procédé dû à AMINOFF (78), analogue au

précédent, légèrement plus sensible, mais dans lequel l'oxydation periodique se fait en milieu moins acide que celui de Warren, l'excès d'acidité n'ayant aucun avantage.

1) Réactifs :

- Acide periodique 0,025 M dans l'acide sulfurique 0,125 N
- Arsénite de sodium : à 2 % en solution dans HCl 0,5 N
- Acide thiobarbiturique (Eastman Kodak) : 0,1 M en solution aqueuse . L'acide étant insoluble dans l'eau, on ajoute de la soude N pour le faire passer à l'état de sel soluble, ce qui est atteint dès pH voisin de 3,5 et ne nécessite pas l'alcalinisation jusqu'à pH 9, prévue par Aminoff. Ce réactif se conserve environ un mois à + 4°C à l'abri de la lumière.
- Butanol acide : Butanol plus 5 % de HCl pur
- Standard : devant la difficulté à se procurer de l'acide sialique pur, nous avons utilisé une protéine commercialisée par "N.B.C." et renfermant 25,5 % d'acide sialique.

On prépare un étalon à 100 µg d'acide sialique par ml soit, pour obtenir 50 ml de solution :

$$\frac{5 \times 100}{25,5} = 19,6 \text{ mg de la protéine titrée ci-dessus.}$$

2) Réaction :

Nous avons tout d'abord recherché le pH optimum de la condensation de l'acide β-formyl-pyruvique avec l'acide thiobarbiturique.

On a préalablement réduit l'acide periodique par action de l'arsénite de sodium.

Dans une série de tubes on introduit la même quantité de produit mais en faisant varier le pH de l'un à l'autre.

On ajoute 2 ml d'acide thiobarbiturique à pH 3,5, on porte 8 minutes à 100°C, refroidit et extrait par 5 ml de butanol acide. On lit contre ce butanol à 549 mµ .

Ce qui donne les résultats suivants : (Fig. 11)

Tube n°	pH	Do de la coloration
1	0,9	0,040
2	1,5	0,130
3	2,2	0,150
4	2,8	0,120
5	3,3	0,100
6	4,7	0,060
7	5,6	0,030
8	6,6	0,010

Le pH optimum de cette réaction se situe donc au voisinage de 2.

La protéine hydrolysée, combinée à l'acide periodique, sur laquelle on fait agir l'arsénite de sodium à un pH voisin de 1.

Si on lui ajoute 2 ml d'acide thiobarbiturique préparé à pH 3,5, on obtient un pH de 2,2 donc proche de l'optimum. C'est pour cette raison que nous avons préparé l'acide thiobarbiturique à ce pH.

- Hydrolyse de la protéine :

L'acide sialique libre donnant seul la réaction, la glycoprotéine doit être préalablement hydrolysée. Se référant aux travaux de COURTOIS (79), on effectue l'hydrolyse par action de l'acide sulfurique 0,1 à 80°C pendant une heure. Nous avons réalisé parallèlement et de la même façon celle du protide étalon, ce qui élimine pratiquement toute erreur de dosage due soit à une hydrolyse insuffisante, soit au contraire à une destruction consécutive à une attaque trop prolongée et ce, du fait que les deux protides ont sensiblement le même comportement à l'hydrolyse.

- Réaction colorée :

On ajoute 0,25 ml d'acide periodique à 0,5 ml des protides hydrolysés, que ce soit le produit à doser ou les étalons.

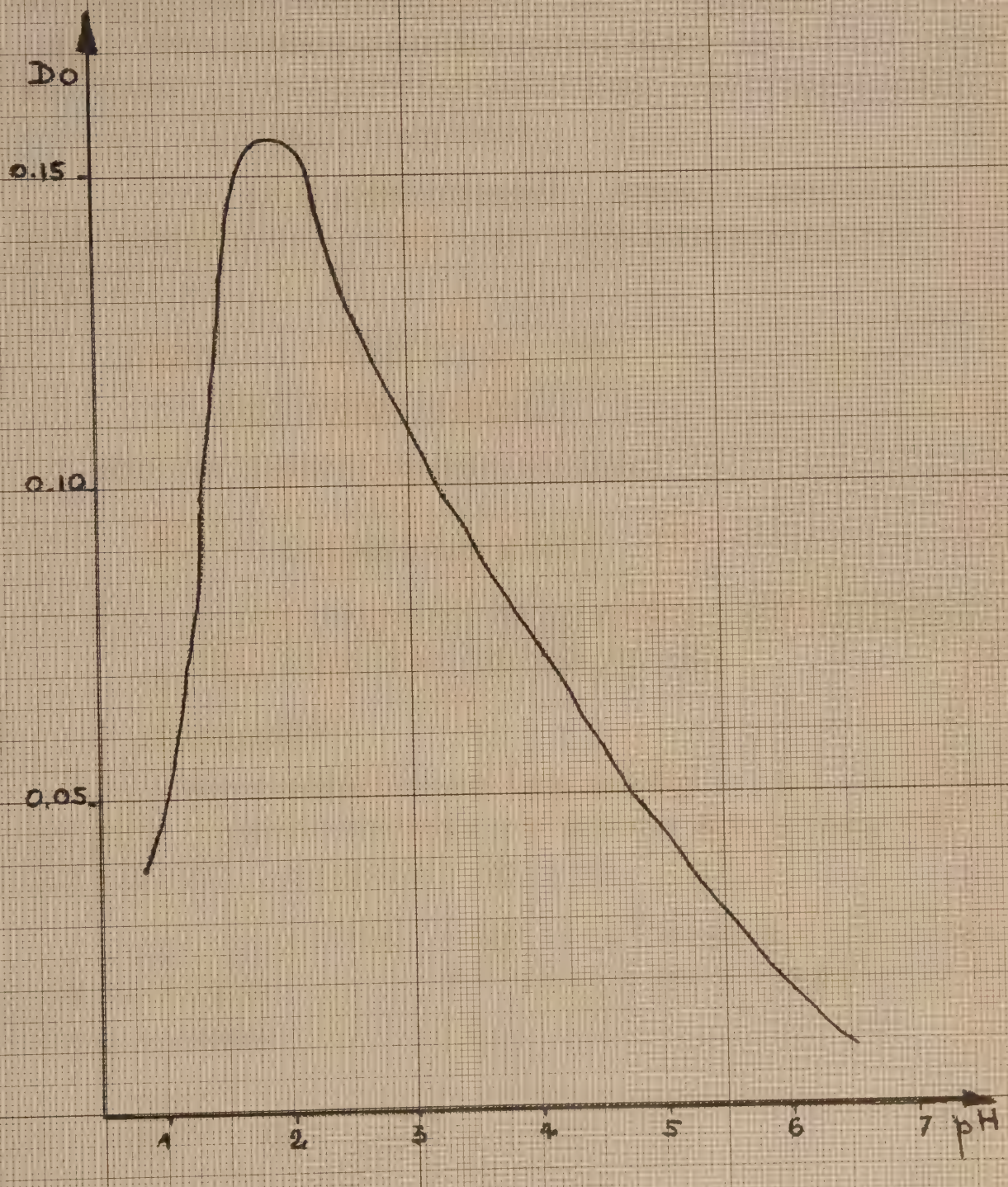


Fig 11

On laisse en contact 30 minutes à 37°C. On réduit alors l'excès d'acide periodique par 0,2 ml d'arsénite de sodium.

La coloration jaune de l'iode disparait après 2 minutes, on ajoute alors 2 ml d'acide thiobarbiturique et on porte 7 à 8 minutes au bain-marie bouillant. Puis on refroidit les tubes au bain de glace et extrait le colorant par agitation avec 5 ml de butanol acide. On forme alors une émulsion que l'on rompt en centrifugeant légèrement.

On lit la coloration extraite contre le solvant de départ à 549 mμ au spectrophotomètre en cuve de 1 cm, la coloration restant stable plus de deux heures.

Se reportant à l'étalonnage, on obtient :

470 μg d'acide sialique par ml

Soit, par rapport au dosage de protéines :

$\frac{470}{8,14}$ = 57 μg par mg de protéine

VI - COMPARAISON ENTRE LES TENEURS EN OSES DE L'HEMOLYSINE PURIFIEE ET DE PROTIDES DIVERS.

1) Sérum sanguin

Nous avons comparé nos résultats sur l'hémolysine à ceux obtenus sur sérum sanguin par WINZLER (80), la teneur en hexuronates étant toutefois celle donnée par DEICHMANN (81).

Leurs résultats étant exprimés en mg d'oses pour 100 ml de sérum, nous les avons convertis en μg par mg de protéines, sachant que 100 ml de sérum en renferment environ 7 mg.

	Sérum Humain		Hémolysines
	mg/100 ml	g/mg protéine	g/mg protéine
Hexoses (Galactose + Mannose)	121	17	96
Hexosamines (Glucosamine + Galactosamine)	83	12	46
Fucose	8,9	1,3	9
Acide Sialique	60	8,5	57
Hexuronates valeurs limites	0,4 à 1,4	0,05 à 0,2	3
TOTAL		39	211
Soit %		3,9	21

L'hémolysine est donc une glycoprotéine qui contient 21 % d'oses. Elle est beaucoup plus riche que le sérum total qui en renferme moins de 4 %.

2) Orosomucoïde

Nous avons également comparé l'hémolysine à l'orosomucoïde, glycoprotéine riche en oses, et dont BOURRILLON (82) donne la teneur en sucres exprimés en % du poids de protéine.

	Orosomucoïde	Hémolysine
Hexoses	14,2	9,6
Fucose	1	0,9
Hexosamines	12,3	4,6
Acide Sialique	10,8	5,7
TOTAL	38,3	20,8

L'hémolysine renferme environ deux fois moins d'oses totaux que l'orosomucoïde, le rapport est toutefois variable selon le sucre considéré, sensiblement égal à un pour le fucose, il s'abaisse jusqu'au tiers dans le cas des hexosamines.

Il est aussi intéressant de comparer l'hémolysine aux différentes glycoprotéines du sérum.

Nous n'avons conservé que les glycoprotéines 19 S, éliminant les autres par trop différentes de l'hémolysine.

AGNERAY (83) indique deux glycoprotéines 19 S. Une macroglobuline $_2$ et une macro globuline.

	Hémolysine	Macroglobuline $_2$	Globuline M
Hexoses	9,6	3,6	5,4
Fucose	0,9	0,1	0,7
Hexosamines	4,6	2,9	4,4
Acide Sialique	5,7	1,8	1,3
TOTAL	20,8	8,4	11,8

Si l'on compare tout d'abord le total, on constate que l'Hémolysine contient environ deux fois plus d'oses que ces deux macroglycoprotéines. Pour les autres sucres, dans une mesure plus large, le rapport est aussi de deux.

L'hémolysine est donc une glycoprotéine sensiblement différente des autres macroglycoprotéines sériques du point de vue teneur en oses.

oOo

- RESUME ET CONCLUSIONS -

L'hémolysine, protéine dont l'action a été découverte par BORDET, est un corps essentiel pour effectuer les réactions de déviation du complément.

PAIC détermina, par ultra-centrifugation, qu'il en existe deux, une 19 S, l'autre 7 S.

Pour produire surtout cette 19 S, nous avons vu qu'il est indispensable de faire une immunisation courte (moins de 20 jours). Différents procédés d'immunisation ayant été essayé, nous avons retenu celui de DARTER, utilisant les injections sous-cutanées de sang total de mouton sur des lapins, suivies de rappels intra-veineux d'hématies lavées.

Le sérum ainsi préparé renferme plus de 20.000 unités hémolytiques 50 % par ml.

Nous avons assuré sa conservation en le maintenant à + 4°C et en s'aidant d'un conservateur chimique : le Merthiolate.

En vue de l'isolement de l'hémolysine par des moyens biologiques, nous avons étudié sa résistance à la température et aux différents pH. Nous l'avons fixée sur stromas puis éluée en milieu alcalin.

Aux procédés biologiques, nous avons préféré les moyens physico-chimiques qui nous ont amenés à étudier successivement l'électrophorèse, la précipitation de globuline 50 % au sulfate d'ammonium, l'ultra-centrifugation de cette globuline, la séparation de l'euglobuline, la concentration protéïque sur ultra-filtre et surtout les divers procédés de séparation protéïque par chromatographie.

Nous avons tout d'abord examiné les méthodes suivantes : adsorption sur phosphate de calcium (hydroxylapatite) et surtout sur celluloses échangeuses d'ions : la carbo-méthyl cellulose échangeuse de cation, qui donne

dans le premier pic l'hémolysine 19 S ; la diéthyl-amino-éthyl cellulose échangeuse d'anions, qui la donne dans le dernier pic et qui peut s'éluer soit par gradient, soit par des tampons successifs de pH décroissants et de molarités croissantes ou les deux combinés.

De bons résultats ont été obtenus sur D.E.A.E. cellulose avec des quantités réduites, mais l'extension de cette méthode à des lots plus importants a conduit à un mauvais rendement qui nous l'a fait abandonner.

A la suite des travaux de FLODIN, nous avons utilisé la filtration sur gel de dextrane polymérisé, le Sephadex G 200, qui donne dans son premier pic d'élution les macroglobulines 19 S, donc l'hémolysine.

La filtration du sérum hémolytique total ne donne pas un bon résultat par suite de la présence d'un inhibiteur du complément. Cet inconvénient disparaît si l'on traite non pas le sérum mais une globuline 50 %.

Utilisant ce procédé, nous avons préparé un lot, dont le produit élué dans ce premier pic a été concentré et nous avons accru la purification par deux ultra-centrifugations isopycniques sur gradient préformé de saccharose.

Les 19 S se trouvent rassemblées dans le pic du fond du tube qui renferme conjointement les anticorps hémolytiques et hémagluttinants.

Ayant dosé les protéines selon la technique de LOWRY, nous avons déterminé que le coefficient de purification était de 29 par rapport au sérum initial.

Cette hémolysine 19 S ainsi purifiée est soumise à l'électrophorèse sur acétate de cellulose : nous avons ainsi révélé essentiellement deux bandes protéiques de macroglobulines, toutes deux hémolytiques. On a donc bien deux anticorps 19 S hémolytiques dans l'hémolysine préparée selon DARTER , indépendamment de l'hémolysine 7 S qui a été, elle, entièrement éliminée.

Ces deux bandes protéiques contenant l'hémolysine sont deux glycoprotéines comme on le vérifie sur le glucidogramme. L'action de la

neuraminidase sur l'hémolysine prouve que l'acide sialique n'est pas en position terminale de l'extrémité non réductrice.

L'analyse glucidique de cette hémolysine macromoléculaire révèle une teneur de 21 % en oses, qui se décompose en 9,6 % d'hexoses, 0,9 % de fucose, 4,6 % d'hexosamines, 5,7 % d'acide neuraminique et 0,3 % d'hexuronates, ce qui la fait classer dans les glycoprotéines.

Nous avons pu, en définitive, réaliser la séparation des hémolysines de lapin anti-mouton et obtenir deux macroglobulines hémolytiques 19 S à haut degré de pureté et en quantités suffisamment importantes pour en permettre l'examen poussé, en particulier du point de vue teneur en oses.

o0o

Vu, le Président de Thèse :
Prof. J.E. COURTOIS

Vu, le Doyen de la Faculté
Prof. G. VALETTE

Vu et Permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
J. ROCHE.

- BIBLIOGRAPHIE -

1 - BORDET J. -

Ann. Inst. Pasteur 12 (1898) 688.

2 - PAIC M.M. -

Bull. Soc. Chim. Biol. 21 (1939) 412.

3 - RAPP H.J. -

Purification and Immunochemical characterization of Heat Stable, Alcohol-soluble Hemolytic Antibody Inhibitor of the sheep Erythrocyte. The John Hopkins University (1953).

4 - KABAT et MAYER'S -

Experimental Immunochemistry
2ème édition (1961) Charles C. Thomas Ed.

5 - DEMANCHE R. -

Précis de technique du séro-diagnostic de la syphilis (1952) Doin Ed.

6 - MAYER M.M., OSLER A.G., BIER O.G. et HEIDELBERGER M. -

J. Exp. Med. 84 (1946) 536.

7 - KOYAMA J. et NASHIMOTO H. -

Japan J. Exp. Med. 29 - 5 (1959) 551.

8 - LAPORTE R. -

Communication personnelle.

9 - ROULIER P. -

Thèse d'Université en pharmacie Montpellier (1950).

10 - TALIAFERRO W.H. et TALIAFERRO L.G. -
J. inf. Dis. 87 (1950) 37.

11 - BUKANTZ S.C., REIN C.R. et KENT J.F. -
J. Lab. & Clin. Med. 31 (1946) 394.

12 - STELOS P., TALIAFERRO L.G. et D'ALESANDRO P.A. -
J. Inf. Dis. 108 (1961) 113.

13 - SOBER H.A. et PETERSON E.A. -
Fed. Proc. 17 (1958) 1116.

14 - STELOS P. -
J. Inf. Dis. 102 (1958) 103.

15 - STELOS P. et TALIAFERRO W.H. -
J. Inf. Dis. 104 (1959) 105.

16 - STELOS P. et TALIAFERRO W.H. -
Analytical Chemistry 31 (1959) 845.

17 - FRANKLIN E.C., HOLMAN H.R., MULLER-EBERHARD H.J., KUNKEL H.G. -
J. Exptl. Med. 105 (1957) 425.

18 - TALMAGE D.W., FRETER G.G. et TALIAFERRO W.H. -
J. Inf. Dis. 98 (1956) 293.

19 - DARTER L.A. -
J. Lab. & Clin. Med. 41 (1953) 653.

20 - REIN et BOSSAK -
Am. J. Syph. Gonoc. and Ven. Dis. 30 (1946) 342.

21 - BRITTON et ROBINSON -
J. Chem. Soc. 137 (1931) 1456.

22 - KOSAKAI M. -
J. Immunol. 3 (1918) 109.

23 - LOCK S., MAIN E.R. et HIRSCH E.F. -
J. Infect. Dis. 37 (1925) 449.

24 - SPIELMANN W. et FRANKFURT M. -
Biblioteca Haematol 12 (1961) 298.

25 - HEIDELBERGER M. et TREFFERS H.P. -
J. Gen. Physiol. 25 (1942) 523.

26 - EULER H. et BRUNIUS E. -
Z. Immun. Forsch 68 (1930) 124.

27 - KLEINE N. -
Bibliotheca Haematol. 6 (1961) 105.

28 - WEINER W. -
British J. Haemat. 3 (1957) 276.

29 - WALPOLE G.S. -
J. Chem. Soc. 105 (1914) 2501.

30 - GOMORI G. -
Methods in Enzymology Vol. I (1955) 138
COLOWICH et KAPLAN Ed. New-York.

31 - DELSAL J.L. -
Communication personnelle.

32 - GIRARD P. et LOURAU M. -
C.R. Soc. Biol. 116 (1934) 1010.

33 - STELOS P. -
J. Immunol. 77 (1956) 396.

34 - KUNKEL H.G. et SLATER R.J. -
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 80 (1951) 42.

35 - STELOS P. et TALMAGE D.W. -
J. Inf. Dis. 100 (1957) 126.

36 - AMIRAIAN K. et LEIKHIM E.J. -

J. Immunol. 87 (1961) 301.

37 - KEKWICK R.A. -

Biochem. J. 34 (1940) 1248.

38 - GREEN A.A. et HUGHES W.L. -

Methods in Enzymology, COLOWICH et KAPLAN Ed. New-York, Vol. I (1955) 76.

39 - KOYAMA J. et NASHIMOTO H. -

Japan J. Exp. Med. 29 - 5 (1959) 561.

40 - SPINCO -

Technical manual Ultracentrifuge Model L.

41 - FERRATA A. -

Berlin Klin. WOCHCHR 44 (1907) 366.

42 - ECKER E.E., PILLEMER L. et SEIFTER S. -

J. Immunol. 47 (1943) 181.

43 - PILLEMER L., SEIFTER S. et ECKER E.E. -

J. Exp. Med. 75 (1942) 421.

44 - LIEFMANN H. -

Munch. Klin. WOCH 56 (1909) 2097.

45 - LEPOW I.H., NAFF G.B., TODD E.W., PENSKY J. et HINZ C.F. -

J. Exp. Med. 117 (1963) 983.

46 - BIER O.G., LEYTON G., MAYER M.M. et HEIDELBERGER M. -

J. Exp. Med. 81 (1945) 449.

47 - ARONSSON T. -

Scand. J. of Clin. & Lab. Invest. 9 (1957) 95.

48 - VAN RAMSHORST J.D. -

Thèse Utrecht (1951).

49 - LEDERER E. -

Chromatographie en chimie organique et biologique. Masson Ed. (1960).

50 - SWINGLE S.M. et TISELIUS A. -

Biochem. J. 48 (1951) 171.

51 - TISELIUS A. -

Arkiv. Kemi 7 (1954) 443.

52 - TISELIUS A., HJERTEN S. et LEVIN O. -

Arch. Biochem. Biophys. 65 (1956) 132.

53 - SORENSEN S.P.L. -

Biochem. Z. 21 (1909) 131 et
22 (1909) 352.

54 - SOBER H.A. et PETERSON E.A. -

J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) - 751.

55 - PETERSON E.A. et SOBER H.A. -

J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) - 756.

56 - SOBER H.A. et PETERSON E.A. -

Vox Sanguinis 2 (1957) 62.

57 - HENRY R., WIRIOT G. et LE BALC'H -

Bull. Soc. Chim. Biol., 47 (1965) 505.

58 - SOBER H.A., GUTTER F.J., WYCKOFF M.M. et PETERSON E.A. -

J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) 756.

59 - LOSPALLUTO J., MILLER W., DORWARD B. et FINK C.W. -

J. Clin. Inv. 41 (1962) 1415.

60 - FLODIN P. -

Thèse Uppsala (1962).

61 - FLODIN P., KILLANDER J. -

Biochem. Biophys. Acta 63 (1962) 403.

62 - KILLANDER J., FLODIN P. -

Vox Sang. 7 (1962) 113.

63 - AMIRAIAN K., FERRIS B. et PURCELL J. -

Annual report of the division of Laboratories and Research for 1963 p. 57.

64 - KNIGHT C.A. -

Chemistry of Viruses.
SPRINGER-VERLAG Ed. Wien (1963) p. 14.

65 - ANDERSON N.G. -

Exp. cell. Res. 9 (1955) 446.

66 - BRAKKE M.K., VATTER A.E. et BLACK L.M. -

Brookhaven Symposium in Biology 6 (1954) 137.

67 - MESELSON M., STAHL F.W. et VINOGRAD J. -

Proc. Nat. Acad. Sci. 43 (1957) 581.

68 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. -

J. Biol. Chem. 193 (1951) 265.

69 - KING E.J. et WOOTTON I.D.P. -

Micro analysis in medical biochemistry (1956) p. 84.

70 - SCHERR H. -

Trans. New-York Academy Sciences 23 (1961) 519.

71 - SHETLAR M.R., FOSTER J.V. et EVERETT M.R. -

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 67 (1948) 125.

72 - BADIN J., JACKSON C. et SCHUBERT M. -

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 84 (1953) 288.

73 - RONDLE C.J.M. et MORGAN W.T.J. -

Biochem. J. 61 (1955) 586.

74 - ADAMS R. et COLEMAN G.H. -

Org. Synth. 2ème Ed. 1 214.

75 - WINZLER R.J. -

Methods of biochemical analysis 2 (1955) 294.

76 - DISCHE Z. -

J. Biol. Chem. 167 (1947) 189.

77 - WARREN L. -

J. Biol. Chem. 234 (1959) 1971.

78 - AMINOFF D. -

Biochem. J. 81 (1961) 384.

79 - COURTOIS J.E., LABAT J. et BARANCOURT N. -

Ann. Biol. Clin. 21 (1963) 383.

80 - WINZLER R.J. -

Meth. Biochem. Anal. 2 (1955) 279.

81 - DEICHMANN et DIERKER -

J. Biol. Chem. 163 (1946) 753.

82 - BOURRILLON R. et GOT R. -

Exposé annuel de Biochimie Médicale 24 (1963) 25.

83 - AGNERAY J. -

Thèse doctorat ès-sciences - Lille (1965).

84 - BISERTE G., BRETON A., HAVEZ R., FONTAINE G. -

Lille Médical. 3 (1958) 3.

85 - DIXON M. et WEBB E. -

Enzymes - 2ème Ed. (1964) Ed. LONGMANS Londres.

86 - BOYER P., LARDY H., MYRBACK K. -

The enzymes - 2ème Ed. 4 (1960) 461.

87 - GOTTSCHALK A. -

Advances in Enzymology 20 (1958) 135.

o0o

- SOMMAIRE -

Page

INTRODUCTION 1

HISTORIQUE 2

PREMIERE PARTIE

IMMUNOLOGIE 4

A / DEFINITION DE L'UNITE HEMOLYTIQUE 6

B / TECHNIQUES SEROLOGIQUES UTILISEES 7

I - ACTIVITE HEMAGLUTINANTE 7

II - ACTIVITE HEMOLYTIQUE 8

1) Recherche de fractions présentant une activité hémolytique. 8

2) Dosage rapide 8

3) Titrage en Unités hémolytiques 50 % 9

C / PREPARATION DE L'HEMOLYSINE 11

I - ETUDE DE L'ANTICORPS EN FONCTION DE LA DUREE D'IMMUNISATION. 11

1) Conditions expérimentales 11

2) Résultats 13

II - ESSAIS DE PROCEDES D'IMMUNISATION 14

1) Procédé TALMAGE 14

2) Procédé DARTER 16

Page

D / CONSERVATION DE L'HEMOLYSINE 21

I - CONGELATION 21

II - EMPLOI D'UN CONSERVATEUR CHIMIQUE 21

E / RESISTANCE DE L'HEMOLYSINE 23

I - RESISTANCE EN FONCTION DES VARIATIONS DE pH 23

II - RESISTANCE A LA TEMPERATURE 24

F / ESSAIS DE PURIFICATION BIOLOGIQUE DE L'ANTICORPS 26

I - PREPARATION DES STROMAS 26

II - FIXATION DE L'HEMOLYSINE SUR STROMAS 27

III - ELUTION DE L'HEMOLYSINE FIXEE SUR STROMAS 28

1) En milieu acide 28

2) En milieu alcalin 29

DEUXIEME PARTIE

Page

ESSAIS DE DIVERS PROCEDES

DE PURIFICATION PHYSIQUES ET CHIMIQUES 31

A / ELECTROPHORESE PREPARATIVE 33

I - ELECTROPHORESE DE TISELIUS 33

II - ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR GEL D'AMIDON 33

B / PRECIPITATION DES GLOBULINES 35

I - PRECIPITATION AU SULFATE DE SODIUM 35

II - PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM 36

C / ESSAI DE PURIFICATION PAR ULTRA-CENTRIFUGATION 38

D / SEPARATION DE L'EUGLOBULINE 41

I - PRECIPITATION PAR DILUTION 41

II - PRECIPITATION PAR DIALYSE 42

III - RESULTATS 42

E / METHODE DE CONCENTRATION PAR ULTRA-FILTRES 44

I - ULTRA-FILTRE L.K.B. 44

II - FILTRE A MEMBRANE DE COLLODION 45

Page

F / SEPARATION DES PROTEINES PAR CHROMATOGRAPHIE 47

I - CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE 47

1) Préparation de l'Hydroxylapatite 48

2) La colonne 48

3) Chromatographie 49

4) Résultats 50

II - CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS D'IONS A BASE DE CELLULOSE 52

1) Cellulose échangeur de cations 52

a) La Carboxy-Méthyl Cellulose 52

b) Chromatographie 53

c) Résultats 53

2) Cellulose échangeur d'anions 54

- Elution par gradient 55

a) Appareillage 55

b) La colonne 56

c) Chromatographie 56

d) Résultats 56

- Elution par tampons successifs 58

a) La colonne 59

b) Chromatographie 59

c) Résultats 59

III - FILTRATION SUR GEL 61

1) Le Sephadex G 200 61

2) La colonne 62

3) Chromatographie 63

4) Résultats 63

TROISIEME PARTIE

Page

PREPARATION DE L'HEMOLYSINE 19 S PURIFIEE. 65

A / OBTENTION DES FRACTIONS HEMOLYTIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE 67

I - TRAITEMENT SUR D.E.A.E. CELLULOSE 67

1) Globuline 50 % 67

2) Chromatographie 68

3) Résultats 68

4) Purification 69

II - TRAITEMENT SUR SEPHADEX G 200 70

1) Essai préliminaire 70

a) Chromatographie 71

b) Résultats 71

c) Purification 72

2) Extension de la méthode 72

B / PURIFICATION DES FRACTIONS HEMOLYTIQUES PAR CENTRIFUGATION SUR GRADIENT 74

I - ESSAI PRELIMINAIRE 74

1) Gradients de centrifugation 74

2) Préparation du gradient 75

3) Résultats 77

II - PURIFICATION DE L'HEMOLYSINE SUR GRADIENT DE CENTRIFUGATION 80

QUATRIEME PARTIE

Page

ANALYSE DE L'HEMOLYSINE 19 S. 83

A / DOSAGE DE PROTEINES 85

1) Préparation du réactif de FOLIN 85

2) Dosage 86

3) Calcul de la purification 86

B / ELECTROPHORESE DE PROTEINES SUR ACETATE DE CELLULOSE 88

C/ ELECTROPHORESE DE GLYCOPROTEINES SUR ACETATE DE CELLULOSE 92

D/ ACTION DE LA NEURAMINIDASE SUR L'HEMOLYSINE PURIFIEE 95

E / DETERMINATION DES OSES DE L'HEMOLYSINE

I - DOSAGE D'HEXOSES 97

1) Réactifs 97

2) Réaction 97

II - DOSAGE D'HEXOSAMINES 98

1) Réactifs 99

2) Réaction 99

III - DOSAGE DE FUCOSE 100

1) Réactifs 100

Page

2) Réaction 101

IV - DOSAGE D'ACIDES HEXURONIQUES 102

1) Réactifs 102

2) Réaction 102

V - DOSAGE D'ACIDE SIALIQUE 103

1) Réactifs 104

2) Réaction 104

VI - COMPARAISON ENTRE LES TENEURS EN OSES DE L'HEMOLYSINE PURIFIEE ET DE PROTIDES DIVERS 106

1) Sérum sanguin 106

2) Orosomucoïde 107

3) Glycoprotéines 19 S 108

RESUME ET CONCLUSIONS

o0o

EDITIONS A.G.E.M.P.
8 RUE DANTE
- PARIS V^e -
ODÉ 58-90